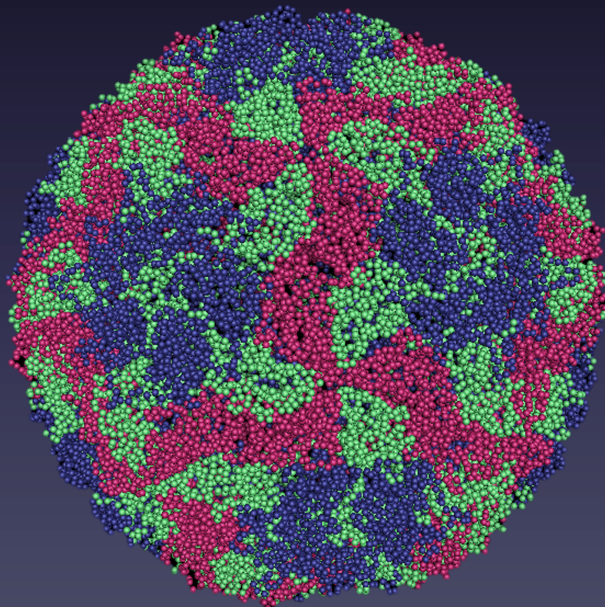




**FACULTAD DE CIENCIAS  
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN  
LA CAPSIDA DEL VIRUS DE LA FIEBRE  
AFTOSA: ALGUNAS IMPLICACIONES PARA  
EL DESARROLLO DE VACUNAS Y  
ANTIVIRALES**



**TESIS DOCTORAL**

**VERÓNICA DEL PILAR RINCÓN FORERO**

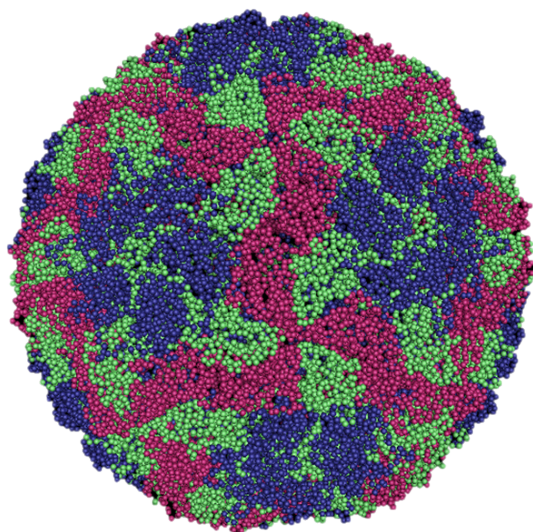
**Madrid, 2012**



**FACULTAD DE CIENCIAS**

**DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA MOLECULAR**

**RELACIONES ESTRUCTURA-FUNCIÓN EN LA CÁPSIDA DEL  
VIRUS DE LA FIEBRE AFTOSA: ALGUNAS IMPLICACIONES  
PARA EL DESARROLLO DE VACUNAS Y ANTIVIRALES**



**TESIS DOCTORAL**

**VERÓNICA DEL PILAR RINCÓN FORERO**

**Madrid, 2012**





Memoria presentada por la Lda. Verónica Del Pilar Rincón Forero para optar al grado de Doctora en Ciencias por la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo ha sido realizado en el Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa” (CSIC-UAM) bajo la dirección del Profesor Mauricio García Mateu. Para su realización se ha contado con una Beca Pre-doctoral FPI (BES-2007-16751).



*A mis padres y hermanas*





## **AGRADECIMIENTOS**

Sin duda este trabajo no hubiera sido posible sin el valioso apoyo de un sin número de personas a lo largo de este años. Expreso mi agradecimiento a todos ellos, ¡Mil gracias!!!.

En primer lugar, agradezco al Prof. Mauricio García Mateu, director de este trabajo, quien me brindó su confianza y que con su ejemplo me ha mostrado las claves de un verdadero científico, siempre dispuesto a explorar y con una enorme capacidad de disertación en cada uno de sus proyectos.

A la Prof. Encarnación Martínez Salas del CBMSO, quien me orientó en el manejo experimental del sistema de vaccinia recombinante, agradezco su ayuda, amabilidad y disposición en la resolución de cada una de mis preguntas técnicas y científicas. También agradezco a Jorge Ramajo, de su grupo de investigación, que me ayudó en el manejo de luminómetro.

Al Prof. Germán Rivas del Centro de Investigaciones Biológicas, por su contribución científica al trabajo sobre el efecto de la aglomeración macromolecular en la actividad de péptidos inhibidores de la unión del virus de la fiebre aftosa (VFA) a su receptor celular.

Al Prof. Francisco Sobrino y su grupo de investigación en el CBMSO, con quienes hemos colaborado en algunos aspectos de su investigación relacionados con la sensibilidad de VFA a pH ácido. En especial al Dr. Miguel Martín-Acebes y la Lda. Ángela Vázquez, con quienes hemos realizado las diferentes purificaciones de viriones y compartido largas horas en cultivos, haciéndolo más entretenido.

Al Prof. Esteban Domingo y la Dra. Cristina Escarmís, quienes contribuyeron con su ayuda científica y técnica a los inicios de este trabajo.

Al Dr. Graham Belsham, del National Veterinary Institute en la Universidad Técnica de Dinamarca y a la Dra. Charlotta Polacek de su grupo de investigación, quienes nos proporcionaron los plásmidos PL1-1 y pSKRH-3C y los protocolos iniciales necesarios para la producción de las cápsidas vacías de VFA.

Al Dr. Michiel Harmsen del Central Veterinary Institute en la Universidad de Wageningen en Holanda, quien nos proporcionó el anticuerpo VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub>, material imprescindible para una parte de este trabajo.

A los miembros del laboratorio 204 del CBMSO, quienes durante estos años nos han permitido utilizar algunos de sus equipos, hubiese sido imposible hacer tantas transferencias de proteínas sin su ayuda.

A todos los miembros de los servicios del CBMSO. Al servicio de Microscopía Electrónica, a Dra. María Teresa Rejas y Milagros Guerra, por su ayuda en el manejo con el microscopio electrónico y en la preparación de cada una de las muestras para su visualización. A los miembros del Servicio de Microscopía Óptica y Confocal, por su orientación cuando fue necesaria en el manejo de cada uno de los equipos. Al personal de cultivos, lavado y esterilización, especialmente a Mercedes Dávila, por su gran colaboración y sus constantes aportes, y a María Ángeles Blanco, Alfonso Gutiérrez y Anunciación Gaceo, por su trabajo eficaz y amabilidad. Al personal de instrumentación, por su disposición en la resolución de todos los problemas técnicos con los equipos.

En especial, a Alicia Rodríguez Huete de nuestro laboratorio, cuya experiencia y eficaz ayuda han permitido culminar la fase final de este trabajo.

A las personas con quienes he compartido en el laboratorio 205 del CBMSO, que han aportado sus ideas y sus aventuras diarias en esta travesía científica y personal. A Alicia, siempre dispuesta a colaborar con una sonrisa, su amabilidad, experiencia y motivación han aportado mucho a nuestro grupo. A Mila, por su entereza, vitalidad y alegría, quien siempre me ha brindado su apoyo y amistad. A Rebeca P., fiel a sus principios y a su ciudad natal “Valladolid”, sin duda hemos compartido muy buenos momentos. A Rebeca B., por su apoyo y amistad, siempre dispuesta a escucharme, por sus aportes “frikis” y sin duda algunas de sus frases que la hacen única. A Pablo, por sus apuntes y curiosidades que han hecho del día a día en el laboratorio más ameno. A Eva y sus particularidades, quien me indico los protocolos iniciales para el desarrollo de

este trabajo. A Inma, su cordialidad y disposición en todo momento. A Miguel Ángel, por su amabilidad, sus aportes en los desayunos, una nueva historia que contar cada día.

A los miembros del laboratorio 121 y 124 del CBMSO, especialmente a Anita, un dechado de cualidades, por su amabilidad, responsabilidad, siempre dispuesta a escuchar y ayudar a todos en todo momento. A Celia, por sus aportes y sus consejos cuando lo he necesitado a nivel experimental, además por su actitud positiva y cordialidad. A Mar, quien siempre me ha brindado su apoyo y con quien hemos hablado largas horas durante nuestra caminata al CBMSO. También gracias a Tania, Vero Martín, Vero Barrioluengo, Armando, Marta...y a todos los que se me quedan por el camino de estos dos grupos tan especiales, además, siempre me han sacado de cualquier apuro si he necesitado algún reactivo.

A los integrantes del laboratorio 105, a Miguel, Ángela, Miguel R., Mónica, Flavia y Yuri, siempre estuvieron dispuestos a ayudarme en cada uno de los momentos transcurridos en el CBMSO.

A las chicas del Colegio Mayor “Miguel Antonio Caro”, que hicieron de mi estancia España durante los primeros años más agradable. Especialmente a Maritza, Erika, Paty y por supuesto a Diana, quien aprecio muchísimo y valoro enormemente cada uno de los momentos que hemos compartido.

A José Ignacio y Eva Amanda, unos grandiosos amigos, con los que he compartido muchos momentos, mi segunda casa en España en la hermosa Galicia, siempre he contado con su disposición y sus consejos.

A Lusk, por su paciencia y comprensión, cada una de sus enseñanzas han fortalecido mi mente y espíritu.

A mi familia, mis adorados padres y hermanas, quien a pesar de la distancia “geográfica”, han estado presente junto a mí todos los días a lo largo de estos años, con sus consejos, comprensión, confianza, por su apoyo y su inmensurable amor.

# ÍNDICE

<b>ABREVIATURAS</b> .....	1
<b>ABSTRACT</b> .....	3
<b>1. INTRODUCCIÓN</b> .....	7
1.1. Análisis estructura-función de partículas víricas.....	9
1.1.1. Análisis mutacional de los determinantes moleculares del ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de partículas víricas .....	10
1.1.2. Estabilización de partículas víricas mediante ingeniería de proteínas con fines biotecnológicos .....	12
1.2. La fiebre aftosa .....	15
1.3. El virus de la fiebre aftosa .....	16
1.3.1. Organización del genoma y proteínas de VFA.....	16
1.3.2. Estructura molecular y antigénica de la cápsida de VFA, y reconocimiento de receptores celulares.....	20
1.3.3. Ensamblaje y desensamblaje del virus de VFA y sensibilidad de la cápsida a pH ácido.....	24
1.4. Vacunas contra la fiebre aftosa.....	28
1.4.1. Vacunas en uso y vacunas experimentales alternativas.....	28
1.4.2. Cápsidas vacías como posibles vacunas contra la fiebre aftosa .....	30
1.5. Diseño de variantes termoestables de VFA .....	32
1.6. Estudio sistemático de la respuesta genética de diferentes variantes virales a la introducción de mutaciones deletéreas en la cápsida de VFA.....	34
1.7. Aglomeración macromolecular y compuestos antivirales.....	35
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	39
<b>3. MATERIALES Y METODOS</b> .....	43
3.1. Disoluciones y tampones .....	45

3.2. Células eucarióticas y su manipulación.....	45
3.2.1. Células BHK-21c2 y su cultivo .....	45
3.2.2. Descongelación de células BHK-21c2 .....	46
3.2.3. Congelación de células BHK-21c2.....	46
3.3. Virus e infecciones .....	47
3.3.1. Virus utilizados .....	47
3.3.2. Amplificación de VFA en células BHK-21c2 .....	47
3.3.3. Titulación de VFA mediante plaqueo .....	48
3.3.4. Amplificación del virus vaccinia vT7f3 en células BHK-21c2.....	48
3.3.5. Titulación del virus vT7f3 mediante ensayo de luciferasa .....	50
3.4. Péptidos sintéticos .....	51
3.5. Plásmidos recombinantes .....	51
3.6. Oligonucleótidos para mutagénesis dirigida, amplificación o secuenciación .....	53
3.7. Mutagénesis dirigida.....	54
3.7.1. Introducción de mutaciones mediante PCR.....	54
3.7.2. Introducción de mutaciones en el plásmido infeccioso de VFA mediante subclonación .....	56
3.8. Transcripción in vitro de ARN de VFA y electroporación de células BHK-21c2 .....	57
3.8.1. Transcripción <i>in vitro</i> de ARN .....	57
3.8.2. Electroporación de células BHK-21c2 .....	58
3.9. Extracción de ARN de VFA .....	59
3.10. Obtención de ADN a partir de ARN vírico mediante RT-PCR .....	60
3.11. Secuenciación .....	60
3.12. Obtención, purificación e inactivación de viriones de VFA .....	61
3.12.1. Obtención y purificación de viriones marcados radiativamente con <sup>35</sup> S .....	61
3.12.2. Obtención y purificación de viriones de VFA no marcados.....	61
3.12.3 Inactivación de viriones de VFA con etilenimina binaria .....	62
3.12.4. Inactivación de viriones de VFA mediante la inducción de actividad endonucleasa .....	62

3.13. Expresión y purificación de cápsidas vacías de VFA.....	63
3.13.1. Expresión analítica de cápsidas vacías de VFA .....	63
3.13.2. Expresión de cápsidas vacías de VFA en el sistema de expresión de virus vaccinia recombinante a gran escala.....	64
3.13.3. Purificación de cápsidas vacías de VFA.....	64
3.13.4. Análisis de la pureza de preparaciones de cápsidas vacías mediante SDS-PAGE y Western Blot .....	67
3.13.5. Análisis y visualización de cápsidas vacías de VFA mediante microscopía electrónica.....	68
3.14. Ensayo de la cinética de producción de VFA.....	68
3.15. Ensayo de la formación de intermediarios de ensamblaje de VFA mediante inmunofluorescencia in situ.....	69
3.16. Análisis de la especificidad antigénica de VFA mutantes.....	70
3.17. Determinación de la estabilidad de viriones y cápsidas vacías de VFA .....	71
3.17.1. Determinación de la estabilidad térmica del virión frente a la inactivación de su infectividad .....	71
3.17.2. Determinación mediante ultracentrifugación de la estabilidad del virión frente a su disociación en subunidades.....	71
3.17.3. Determinación mediante ELISA de la estabilidad térmica del virión frente a su disociación en subunidades.....	72
3.17.4. Determinación de la estabilidad térmica de la cápsida vacía frente a su disociación en subunidades.....	74
3.18. Ensayo de toxicidad celular .....	75
3.19. Ensayo <i>ex vivo</i> de inhibición de la interacción virus-receptor celular .....	75
3.20. Análisis de la estructura cristalográfica y modelado molecular de la cápsida de VFA, y análisis de conservación de su secuencia .....	76
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>79</b>
4.1. Caracterización bioquímica e inmunoquímica de viriones de VFA modificados racionalmente para incrementar su estabilidad frente a la disociación térmica .....	81
4.1.1. Evaluación de la termoestabilidad de VFA T2023C/A3145C .....	83



4.1.2. Caracterización bioquímica e inmunoquímica de VFA A2065H y VFA D3069E/T2188A.....	84
4.2. Investigación de las bases moleculares del efecto termoestabilizante de las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A en el virión de VFA.....	90
4.2.1. Efectos de una fuerza iónica elevada sobre la estabilidad frente la disociación térmica de los variantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A y del virus parental	90
4.2.2. Efectos de mutaciones de residuos que puedan estar implicados en interacciones iónicas repulsivas en la cápsida de VFA sobre la estabilidad del virión frente a la disociación térmica .....	93
4.2.3. Evaluación del efecto sobre el virión de la combinación de las mutaciones presentes en los variantes termoestables basados en la eliminación de interacciones electrostáticas entre subunidades.....	104
4.3. Construcción y caracterización de cápsidas vacías recombinantes de VFA modificadas mediante ingeniería de proteínas para incrementar su estabilidad frente a la disociación térmica .....	106
4.3.1. Puesta a punto de un sistema de expresión y purificación de cápsidas vacías de VFA C-S8c1 basado en virus vaccinia recombinante .....	107
4.3.2. Construcción, purificación y análisis de la estabilidad térmica de cápsidas vacías recombinantes de VFA A2065H y D3069E/T2188A.....	110
4.4. Investigación de las bases moleculares de la compensación del efecto letal de una mutación en la interfase entre pentámeros mediante una mutación compensatoria en una posición “ <i>hot spot</i> ” en la cápsida de VFA.....	115
4.4.1. Análisis de los efectos de las mutaciones H3141A, N2019H y H3141A/N2019H sobre el ensamblaje y estabilidad frente a disociación de la cápsida vacía de VFA .....	117
4.4.2. Análisis de la estabilidad de VFA mutantes frente a la disociación a pH ácido ...	122
4.5. Análisis de la importancia funcional de los residuos localizados en las interfases entre subunidades protoméricas de la cápsida de VFA .....	124
4.5.1. Análisis de la participación de la cadena lateral en las interfases entre subunidades protoméricas de la cápsida de VFA .....	125
4.5.2. Evaluación del efecto sobre la infectividad de VFA causado por el truncamiento de la cadena lateral de residuos implicados en interacciones interprotoméricas.....	127

4.5.3. Efecto de la pérdida de interacciones críticas en la interfase interprotómero en la estabilidad del virión de VFA frente a su inactivación térmica.....	132
4.5.4. Papel de residuos en las interfases entre protómeros en etapas del ciclo viral previas al ensamblaje .....	134
4.5.5. Análisis de correlación entre la importancia funcional, la conservación evolutiva y la localización en la estructura del virión, para los residuos en las interfases entre protómeros. ....	135
4.6. Evaluación del efecto de la aglomeración macromolecular en la actividad de moléculas inhibidoras del reconocimiento entre un virus y su receptor celular.....	140
4.6.1. Evaluación de la toxicidad del agente de aglomeración macromolecular .....	141
4.6.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos sobre el reconocimiento VFA-receptor celular .....	142
4.6.3. Evaluación del efecto de aglomeración macromolecular sobre la inhibición por péptidos del reconocimiento VFA-receptor celular.....	143
<b>5. DISCUSIÓN .....</b>	<b>147</b>
5.1. Repulsiones electrostáticas entre pentámeros contribuyen a la inestabilidad del virión de VFA .....	149
5.2. Mutaciones compensatorias en las interfases entre pentámeros y su relación con estabilidad de la cápsida de VFA .....	153
5.3. Estabilización de partículas de VFA para el desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre aftosa .....	155
5.3.1. Vacunas basadas en viriones termoestables inactivados químicamente.....	155
5.3.2. Vacunas basadas en cápsidas vacías de suficiente termoestabilidad.....	159
5.4. Comparación de las diferentes interfases entre las subunidades de la cápsida de VFA .....	160
5.5. La aglomeración macromolecular reduce la actividad de agentes antivirales.....	162
<b>6. CONCLUSIONES .....</b>	<b>167</b>
<b>7. BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>171</b>



## ABREVIATURAS

ADN	Ácido desoxirribonucleico
ADNc	ADN complementario
ARN	Ácido ribonucleico
BEA	Hidrobromuro de 2-bromoetilamina
BEI	Etilenimina binaria
BHK	Células de riñón de hámster
BSA	Albúmina sérica bovina
CCMV	Virus del moteado clorótico del caupí ( <i>cowpea chlorotic mottle virus</i> )
CA	Proteína de la cápsida del virus de la inmunodeficiencia humana
Cre	Elemento replicativo que actúa en <i>cis</i>
Ct	Carboxilo terminal
CTD	Dominio carboxilo terminal de CA
DEPC	Dietilpirocarbonato
DMEM	Medio Eagle modificado por Dulbecco
DMSO	Dimetil sulfóxido
DO	Densidad óptica
EDTA	Ácido etilendinitrilotetraacético
EHF	Método <i>expand high fidelity</i>
FA	Fiebre Aftosa
KLH	Hemocianina de <i>keyhole limpet</i>
h.p.e.	Horas post-electroporación
h.p.t.	Horas post-transfección
IRES	Sitio de entrada interna del ribosoma
LB	Medio de cultivo Luria-Bertani
mc	Cadena principal
m.d.i.	Multiplicidad de infección
MAb	Anticuerpo monoclonal
MLV	Virus de la leucemia murina ( <i>murine leukemia virus</i> )
MP	Marcador de peso
MVM	Virus diminuto del ratón ( <i>minute virus of mice</i> )
NC	Nitrocelulosa
NTD	Dominio amino-terminal de CA
p.b.	Pares de bases

PBS	Tampón fosfato salino
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa
PDB	Banco de datos de proteínas ( <i>Protein Data Bank</i> )
PFU	Unidades formadoras de placa
PoliA	Poliadenilato
PoliC	Policitidilato
RT-PCR	Reacción de transcripción inversa seguida de amplificación por PCR
r.p.m.	Revoluciones por minuto
sc	Cadena lateral
SDS-PAGE	Electroforesis en gel de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico
SFB	Suero fetal bovino
t.a.	Temperatura ambiente
TNF- $\alpha$	Factor de necrosis tumoral alfa
TMV	Virus del mosaico del tabaco ( <i>tobacco mosaic virus</i> )
VFA	Virus de la fiebre aftosa ( <i>foot-and-mouth disease virus</i> )
VIH-1	Virus de la inmunodeficiencia humana tipo 1
VLP	Partículas semejantes a cápsidas

## Códigos de una y tres letras para los aminoácidos

---

Alanina	Ala, A	Leucina	Leu, L
Arginina	Arg, R	Lisina	Lys, K
Ácido aspártico	Asp, D	Metionina	Met, M
Asparagina	Asn, N	Fenilalanina	Phe, F
Cisteína	Cys, C	Prolina	Pro, P
Ácido glutámico	Glu, E	Serina	Ser, S
Glicina	Gly, G	Tirosina	Tyr, Y
Glutamina	Gln, Q	Treonina	Thr, T
Histidina	His, H	Triptófano	Trp, W
Isoleucina	Ile, I	Valina	Val, V

---



## **ABSTRACT**



## **ABSTRACT**

Foot and mouth disease virus (FMDV) is the causative agent of one of the economically most important animal diseases worldwide. We have used mutational analysis and other approaches to study different aspects of the assembly, stability and disassembly of the virion and capsid of FMDV, and their implications for the design of improved or novel anti-FMD vaccines, and the screening of antiviral agents.

In the first part of this study, we have confirmed that two engineered FMD virions (D3069E/T2188A and A2065H) have a substantially increased stability against thermal dissociation, relative to the parent virion. In addition, have shown that these variants preserve the virion production rate and are antigenically indistinguishable from the parent virion, both before and after chemical inactivation. These and other observations suggest that these engineered FMDVs constitute good candidates for the development of thermostable vaccines against FMD.

In the second part, we have investigated the mechanism by which mutation A2065H exerts its thermostabilizing effect. As a result, we have detected the presence in the FMD virion of coulombic repulsions between pentamers, even at neutral pH, which contribute to explain the low thermostability of this virus and its empty capsid. The carboxylates of D2068, E2086, D3134 y D3195 are involved in this electrostatic repulsion. Most likely, mutation A2065H stabilizes the virion because the positive charge introduced may partly neutralize some of the negative charges involved in the interpentameric repulsion. The discovery of this repulsion allowed us to undertake a rational protein engineering approach to obtain four additional FMDV variants of increased thermostability (D2068N, E2086Q, D3134N y D3195N). These variants also constitute candidates for development of thermostable vaccines against FMD.

In the third part, we have set up a procedure to obtain reasonably purified non-mutant and mutant recombinant empty capsids of FMDV, and a method to analyze their thermostability. Using this system, we found that the A2065H y D3069E/T2188A mutations that thermostabilize the FMD virion also stabilize the empty capsid to a similar extent. These results are relevant for the development of novel FMD vaccines based on recombinant empty capsids.

In the fourth part, we have carried out preliminary experiments that indicate that the lethal H3141A mutation at the interpentameric interfaces in the FMDV capsid interferes with capsid assembly. In turn, the secondary, compensatory mutation N2019H, that was fixed in FMDV populations in response to the introduction of the H3141A mutation, is able to restore normal capsid assembly. Engineered empty capsids H3141A and, especially N2019H y H3141A/N2019H, are substantially more stable than the parental empty capsid, and constitute additional candidates for the development of thermostable FMD vaccines.

In the fifth part, we have performed a thorough molecular dissection by alanine scanning of the interfaces between the protomers that form the pentameric intermediates during FMDV assembly. We found that, individually, most interactions between residues at the interprotomeric interfaces are dispensable for capsid assembly and virus infectivity.

In the sixth part, we have experimentally verified the theoretical prediction that the inhibitory activity of a small molecule (a synthetic peptide) on a macromolecular recognition process, the interaction between the FMDV virion and its cellular receptor, may be significantly reduced in a macromolecularly crowded environment. This observation has implications for a better understanding of molecular recognition of virus particles in physiological environments and the design of antiviral agents.

## **INTRODUCCIÓN**





# 1. INTRODUCCIÓN

## 1.1. Análisis estructura-función de partículas víricas

Durante las últimas décadas los virólogos moleculares y estructurales han obtenido un conocimiento detallado, aunque todavía incompleto, de la estructura, dinámica, propiedades y funciones de las partículas víricas (Chiu *et al.*, 1997; Agbandje-McKenna y McKenna, 2011). Las estructuras de muchos viriones y cápsidas víricas se han determinado mediante criomicroscopía electrónica y, a resolución atómica o casi atómica, mediante cristalografía de rayos X (ver, por ejemplo, Rossmann y Johnson, 1989; Natarajan *et al.*, 2005; Rossmann *et al.*, 2005; Johnson, 2008; Zhou, 2008; Govindasamy *et al.*, 2011; Domsic y McKenna, 2011). Muchos de los datos estructurales obtenidos, además de ser depositados en el Protein Data Bank (PDB), han sido catalogados de forma particularmente detallada en la base de datos para virus icosaédricos, VIPER (Reddy *et al.*, 2001; Natarajan *et al.*, 2005; Carrillo-Tripp *et al.*, 2009).

La gran cantidad de información estructural detallada que se ha ido obteniendo para un buen número de partículas víricas ha permitido o facilitado el análisis mediante mutagénesis dirigida de la relación entre su estructura y función (Chiu *et al.*, 1997; Agbandje-McKenna y McKenna, 2011; para algunos artículos muy recientes ver, por ejemplo, Mueller *et al.*, 2009; Sanjuán 2010; Wickramasekera y Traktman, 2010; Neu *et al.*, 2010; Cortines *et al.*, 2011; Rychlowska *et al.*, 2011; Samai y Shuman, 2011; Vleck *et al.*, 2011; Xie *et al.*, 2011; McCaffrey *et al.*, 2012). Además, de contribuir al conocimiento de las bases estructurales del funcionamiento de los virus, la modificación de viriones o cápsidas mediante ingeniería de proteínas puede ayudar al desarrollo de partículas víricas adecuadas para diferentes aplicaciones biomédicas o industriales (para algunas revisiones, ver Douglas y Young, 2006; Saini *et al.*, 2006; Singh *et al.*, 2006; Fischlechner y Donath, 2007; Steinmetz *et al.* 2009; Mateu, 2011).

En esta tesis doctoral nos hemos centrado en el estudio mediante análisis mutacional de aspectos relacionados con el ensamblaje, estabilidad o desensamblaje de partículas víricas, y en algunas posibles implicaciones o aplicaciones para el diseño de nuevas vacunas y antivirales. El virus modelo utilizado ha sido el virus de la fiebre aftosa (VFA),

tanto por el conocimiento disponible sobre el mismo como por la importancia económica a nivel mundial de la enfermedad que causa en animales de interés ganadero.

### **1.1.1. Análisis mutacional de los determinantes moleculares del ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de partículas víricas**

Los virus son ensamblados macromoleculares metaestables, donde su estructura está diseñada para contener y proteger el genoma viral, y posteriormente liberarlo a una célula huésped específica para que ocurra su replicación (Prasad y Schmid, 2012). En muchos virus la cápsida necesita mantener una suficiente estabilidad extracelular y, al mismo tiempo, debe ser lo suficientemente inestable, o metaestable, como para permitir la desencapsidación del genoma (Chiu *et al.*, 1997; Zlotnik y Bentley, 2011; Bothner y Hilmer, 2011). Por tanto, la estabilidad de las cápsidas víricas y sus transiciones entre estructuras estables e inestables son cuestiones claves en el ciclo viral. El número de estudios estructura-función mediante mutagénesis dirigida que exploran aspectos relacionados con el ensamblaje, estabilidad conformacional y desensamblaje de partículas víricas es aún relativamente escaso. Las dificultades para este tipo de estudios incluyen el enorme tamaño de estos complejos macromoleculares, el gran número de interacciones y residuos potencialmente implicados en esos procesos, el carácter generalmente irreversible de las reacciones de ensamblaje y desensamblaje (que impide el análisis termodinámico), y la complejidad de estas reacciones.

A pesar de estas limitaciones, existe un apreciable número de estudios estructura-función de partículas víricas que abordan partes de estos aspectos utilizando diferentes virus modelo (para algunas referencias recientes de otros grupos ver, por ejemplo, Ganser-Pornillos *et al.*, 2004; Leung *et al.*, 2008; Ma *et al.*, 2008a; Wu *et al.*, 2008; Caciagli *et al.*, 2009; Dierkes *et al.*, 2009; Kawano *et al.*, 2009; Lepère-Douard *et al.*, 2009; Yu *et al.*, 2009; Mueller *et al.*, 2009; Sanjuán 2010; Bolstad *et al.*, 2011; Datta *et al.*, 2011; Pokrovskii *et al.*, 2011; Someya y Fakeda, 2011; Jones *et al.*, 2011; Doyle *et al.*, 2012; Snyder *et al.*, 2012; Lemay y Bisailon *et al.*, 2012; Yang *et al.*, 2012). En nuestro laboratorio, desde hace varios años se vienen desarrollando estudios de estructura-función sobre los determinantes moleculares del ensamblaje, estabilidad y dinamismo conformacional de partículas víricas utilizando tres virus modelo, VFA, el virus diminuto

del ratón (MVM) y el virus de la inmunodeficiencia humana (VIH-1) (Mateu 2002; Mateo *et al*, 2003, 2007, 2008; Mateo y Mateu, 2007; del Álamo *et al*, 2003, 2005a, 2005b; Reguera *et al*, 2004, 2005; Carreira *et al.*, 2004, 2006; Carrasco *et al*, 2006, 2008; Luna *et al*, 2009; Pérez *et al.*, 2011; Bocanegra *et al*, 2011; Castellanos *et al*, 2012).

Los análisis mutacionales llevados a cabo en estos estudios han permitido obtener diversos resultados importantes para entender las relaciones entre estructura y función en cápsidas víricas, a nivel de residuos aminoacídicos individuales. Entre otros avances generales, podemos citar: i) identificación de las proteínas, dominios proteicos y residuos individuales en partículas víricas que son indispensables para el desarrollo del ciclo viral completo; ii) determinación de los dominios, regiones y residuos de la cápsida y del ácido nucleico vírico que participan en etapas específicas del ciclo vírico o confieren determinadas propiedades biológicamente relevantes y, en algunos casos, averiguar los mecanismos moleculares subyacentes; iii) determinación de la contribución de diferentes residuos al ensamblaje, mantenimiento de la estabilidad de la cápsida o proceso de desensamblaje; iv) identificación de cambios conformacionales biológicamente relevantes en partículas víricas, y sus bases estructurales; v) identificación de mutaciones compensatorias en cápsidas víricas que restauran los efectos desfavorables de otras mutaciones; vi) modificación de propiedades y funciones de viriones y cápsidas con fines biotecnológicos.

En lo referente a algunos aspectos que venimos estudiando en nuestro grupo, los determinantes de ensamblaje, estabilidad o desensamblaje de partículas víricas, la mayoría de los análisis mutacionales se ha centrado en el papel de un número muy limitado de residuos de la cápsida de algunos virus modelo. A continuación se mencionan unos pocos ejemplos concretos, dejando para un apartado posterior algunos resultados que nuestro grupo obtuvo para VFA. Estudios de estructura-función en la cápsida del bacteriófago MS2, mostraron que tres mutaciones (T59S, Y129C y C46W) confirieron un aumento de la estabilidad térmica, la cual podría deberse al establecimiento o a la eliminación de interacciones entre subunidades (Stonehouse y Stockley, 1993). Tanto en rinovirus como en poliovirus se han identificado mutaciones en la cápsida que modifican su estabilidad. Algunas de éstas parecen actuar favoreciendo o dificultando cambios conformacionales que ocurren durante la desencapsidación y que dependen de la presencia de un bolsillo hidrofóbico presente en la cápsida de estos virus (Filman *et al.*, 1989; Reynolds *et al.*,

1992; Wang *et al.*, 1998). En el virus del mosaico del tabaco (TMV) se mutagenizaron tres residuos (de treonina a triptófano) implicados en varias interacciones intersubunidad en la cápsida. Sorprendentemente, una de estas mutaciones fue capaz de conferir cierto aumento en la estabilidad, quizá debido al establecimiento de nuevas interacciones hidrofóbicas con aminoácidos de subunidades adyacentes. No obstante, esta mutación impidió la formación de viriones infecciosos (Bendahmane *et al.*, 1997). La sustitución de un residuo del extremo N-terminal de la proteína VP1 en la cápsida del cocksackievirus A9 condujo a la formación de un mutante de estabilidad incrementada, que estaba negativamente afectado en su desencapsidación y en su capacidad infectiva (Airaksinen *et al.*, 2001). Un número de estudios en diferentes virus han mostrado que las interacciones electrostáticas que involucran residuos cargados pueden tener un papel importante en el ensamblaje de la cápsida, estabilidad o desensamblaje (por ejemplo, Culver *et al.*, 1995; Reguera *et al.*, 2004; Douglas *et al.*, 2004; del Álamo y Mateu, 2005; Mateu, 2009).

### **1.1.2. Estabilización de partículas víricas mediante ingeniería de proteínas con fines biotecnológicos**

Los virus naturales y sus cápsidas no tienen todas las propiedades y funcionalidades requeridas, o no han sido optimizadas, para muchas de sus posibles aplicaciones biotecnológicas. Por ello, existe un gran interés en desarrollar estrategias para realizar exitosamente diferentes modificaciones de partículas víricas con fines aplicados (Mateu 2011).

Una de las modificaciones de partículas víricas que presenta un interés aplicado más general es la mejora de su estabilidad conformacional y resistencia a la disociación por acción de agentes físicos o químicos. Para algunas aplicaciones, puede ser necesario mantener la metaestabilidad conformacional y/o inestabilidad conformacional de la partícula vírica natural. Los viriones para aplicaciones de terapia génica y las cápsidas vacías o VLPs (partículas semejantes a cápsidas, o *Virus-Like Particles*) para la liberación dirigida de fármacos pueden necesitar cierto grado de inestabilidad/mestaestabilidad para permitir su desensamblaje y la liberación de su carga en células diana. No obstante, incluso en estos casos puede ser deseable incrementar la estabilidad de la partícula vírica (Powell *et al* 2000). Para muchas otras posibles aplicaciones de partículas víricas (por ejemplo,

vacunas, técnicas de contraste de imagen y diagnóstico, nanomateriales estructurados, etc.), las partículas víricas no sólo no necesitarían ser conformacionalmente dinámicas, sino que puede ser conveniente, o incluso imprescindible, que presenten una gran estabilidad conformacional y resistencia al desensamblaje. De hecho, es frecuente que las partículas víricas se tengan que encontrar con condiciones químicas o físicas adversas durante su purificación, el proceso de fabricación del producto final basado en ellas, su almacenamiento, o su utilización real. Elevadas temperaturas, condiciones ácidas o deshidratantes, una alta presión hidrostática, la fuerza centrífuga, los solventes orgánicos o los reactivos químicos usados en la funcionalización de partículas víricas, pueden provocar su disociación o generar cambios conformacionales indeseados. Los re-arreglos conformacionales, con o sin desintegración de la partícula, podrían provocar la pérdida de la función por diversas razones, incluyendo la liberación prematura de la carga, la distorsión de las moléculas activas en la superficie de la cápsida, o cambios en la posición relativa de los componentes funcionales. En todos estos casos, puede ser deseable, o imprescindible, conseguir la mayor estabilidad física que sea posible (Mateu *et al*, 2011).

Se han investigado algunas aproximaciones y metodologías para el mejoramiento intrínseco de la estabilidad física de las partículas víricas, basadas en la modificación por procedimientos químicos, evolución dirigida, o ingeniería de proteínas racional. Algunos ejemplos de estabilización en diferentes partículas víricas en diferentes virus modelo se revisan brevemente a continuación.

La estabilización de partículas víricas mediante procedimientos químicos se ha probado en algunos casos. Esta aproximación puede ser compleja, costosa y no enteramente reproducible. Por ejemplo, se ha demostrado que el tratamiento con formaldehído o glutaraldehído pueden estabilizar la cápsida del virus del mosaico del pepino cepa Q (Francki y Habili, 1972) o el virus del mosaico de la alfalfa (Hajimorad y Francki, 1991), respectivamente. A su vez, estudios de Johnson *et al* (2007), mostraron que cuando el bacteriófago MS2 fue solubilizado en solventes orgánicos presentó un incremento a la resistencia contra la inactivación térmica a 90°C. Otros estudios han apuntado hacia la estabilización de diferentes picornavirus por sales o cationes (Dorval *et al.*, 1989), lisina y otras diaminas (Dorval *et al.*, 1990) o ácidos grasos de cadena corta (Ismail-Cassim *et al.*, 1990), entre otros compuestos. Además, la combinación de modificaciones químicas y genéticas podría considerarse una alternativa prometedora

(Boeckle y Wagner, 2006)

Muy pocos estudios han utilizado técnicas combinatoriales de evolución dirigida para la selección de variantes víricas que posean una mayor estabilidad física. En uno de estos estudios, con el objetivo de aislar virus que fueran más resistentes a los procesos de fabricación, se encontró que seis de las cepas del virus de la leucemia murina (MLV) obtenidas por la técnica de ADN *shuffling* (transposición de secuencias de ADN), fueron significativamente más estables que el virus parental frente a la inactivación térmica por ultracentrifugación (Powell *et al.*, 2000). En otro estudio, con este mismo virus con el fin de obtener una variante estable, el genoma fue aleatoriamente mutado y los viriones producidos que presentaran suficiente termoestabilidad fueron seleccionados mediante incubación prolongada a 37°C, que inactivó los variantes menos estables. Se identificó de este modo una mutación sencilla en la proteasa viral, como la responsable de aumentar la estabilidad de la cápsida (Vu *et al.*, 2008).

En algunas ocasiones se ha utilizado la ingeniería de proteínas racional para modificar la estabilidad de partículas víricas mediante la introducción de interacciones adicionales entre subunidades, por ejemplo puentes disulfuro. Se ha descrito que los puentes disulfuro naturales están involucrados en la estabilización de las cápsidas de varios virus en entornos extracelulares no reductores (Zhou y Standring, 1992; Li *et al.*, 1998; Ashcroft *et al.*, 2005, Caldeira y Peabody, 2007). Para el virus del moteado clorótico del caupí (CCMV), se encontró que un mutante natural adquirió una mutación a Cys (R26C en la proteína de la cubierta) que permitió la formación de un enlace de puente disulfuro, que provocó el aumento de la resistencia a la disociación. Para el virus de la hepatitis B, se ha descrito la participación en la estabilidad de la cápsida de cuatro residuos de cisteína (48, 61, 107, and 185) muy conservados en la superficie de la cápsida, que forman puentes disulfuro intermoleculares una vez ensamblada ésta (Zhou y Standring, 1992). En el bacteriófago Q $\beta$  la presencia un puente disulfuro se ha correlacionado con un aumento de la termoestabilidad (Golmohammadi *et al.*, 1996). Apoyándose en estos resultados, se ha utilizado una aproximación basada en homología para introducir en la cápsida del bacteriófago MS2 dos cisteínas (Cys 74 y Cys 80) equivalentes a las cisteínas en Q $\beta$ . Bajo condiciones no-reductoras, esta cápsida variante presentó un incremento en la termoestabilidad con respecto a la cápsida no mutada (Ashcroft *et al.*, 2005).

Como se ha mencionado en el numeral 1.1.2, las interacciones electrostáticas entre

residuos cargados pertenecientes a diferentes subunidades pueden tener un papel importante en el ensamblaje, estabilidad o desensamblaje de la cápsida de algunos virus. Así, la ingeniería racional de interacciones electrostáticas entre la subunidades podría proveer una aproximación general para la estabilización térmica de las partículas virales. Comparada con la introducción de los enlaces disulfuro, la introducción de interacciones electrostáticas podría tener la ventaja de ser mucho menos exigente esteroquímicamente. En nuestro laboratorio iniciamos hace tiempo un estudio con el objetivo final de obtener variantes termoestables de VFA mediante ambas aproximaciones (numeral 1.5), estudio que hemos continuado como una parte del presente trabajo.

## **1.2. La fiebre aftosa**

La fiebre aftosa (FA) es una enfermedad muy contagiosa que afecta a animales de pezuña hendida (artiodáctilos), fundamentalmente a ganado bovino y porcino (Pereira, 1981; Brooksby, 1982; Ferguson *et al.*, 2001; Sobrino y Domingo, 2001, 2004; Sobrino *et al.*, 2001). La FA fue descrita en el norte de Italia en el siglo XVI por Hieronymus Fracastorius (Fracastorius, 1546; Wright, 1930). Es la enfermedad animal que ocasiona las pérdidas económicas más importantes a escala mundial, debido a descensos de la producción ganadera, a las restricciones en el movimiento de ganado y de sus productos derivados, al cierre de mercados, a los gastos de vacunación, al sacrificio de animales infectados y de aquellos que han estado en contacto con ellos y a otras repercusiones económico-sociales de los brotes de la FA. Como ejemplo, el brote de FA en el Reino Unido en 2001 supuso pérdidas de aproximadamente seis mil millones de libras esterlinas (Thompson *et al.*, 2002), y el sacrificio masivo de animales en diferentes lugares de Europa (Pluimers *et al.*, 2002; Scudamore *et al.*, 2002).

Existen múltiples vías de transmisión del virus, incluidas el contacto directo, transporte mecánico, aerosoles, ingestión, etc. El virus penetra en el organismo a través de los epitelios, causando una infección aguda caracterizada por fiebre y aftas, principalmente en lengua, boca y pezuñas. En animales adultos afectados de la enfermedad vesicular típica, la mortalidad no suele superar el 5% (Timoney *et al.*, 1988) mientras que en animales jóvenes afectados de miocarditis asociada al VFA, la tasa de mortalidad se aproxima al 50%. Tras la fase aguda de la enfermedad se puede establecer una infección



persistente en rumiantes en la que el virus persiste de forma asintomática en el esófago y garganta por periodos prolongados de tiempo. Estos animales portadores asintomáticos constituyen una reserva natural de virus muy extendida en todo el mundo y se sospecha que pueden originar nuevos brotes de la enfermedad aguda en animales sanos, dificultando aún más el control de la enfermedad (Burrows *et al.*, 1966; Gebauer *et al.*, 1988; Salt, 1993, 2004).

La FA es una enfermedad enzoótica en muchas regiones de África, Asia, América del Sur y Europa del Este (Rweyemamu *et al.*, 2008; Grubman y Baxt, 2004). Más de 100 países aún no son reconocidos oficialmente libres de la FA por la Organización mundial de sanidad animal (OIE), mientras que sesenta y cinco países han logrado obtener oficialmente el estatus de “país libre de FA sin vacunación” votado por la Asamblea Mundial de Delegados de la OIE. En los últimos años se han registrado casos de brotes de FA en países que se consideraban libres de la enfermedad como Taiwan (Dunn y Donaldson, 1997), Japón (Boletín OIE nº 13, vol. 13, año 2000), Grecia (Boletín OIE nº 13, vol. 26, año 2000), Reino Unido (Ferguson *et al.*, 2001; Giles, 2001; Thompson *et al.*, 2002); Holanda (Knowles *et al.*, 2005), además de re-emergencias en varios países de América del sur (Correa Melo *et al.*, 2002), por ejemplo, los recientes brotes de FA en Uruguay y Paraguay en 2011 y 2012 (consultar: <http://new.paho.org/panaftosa/>).

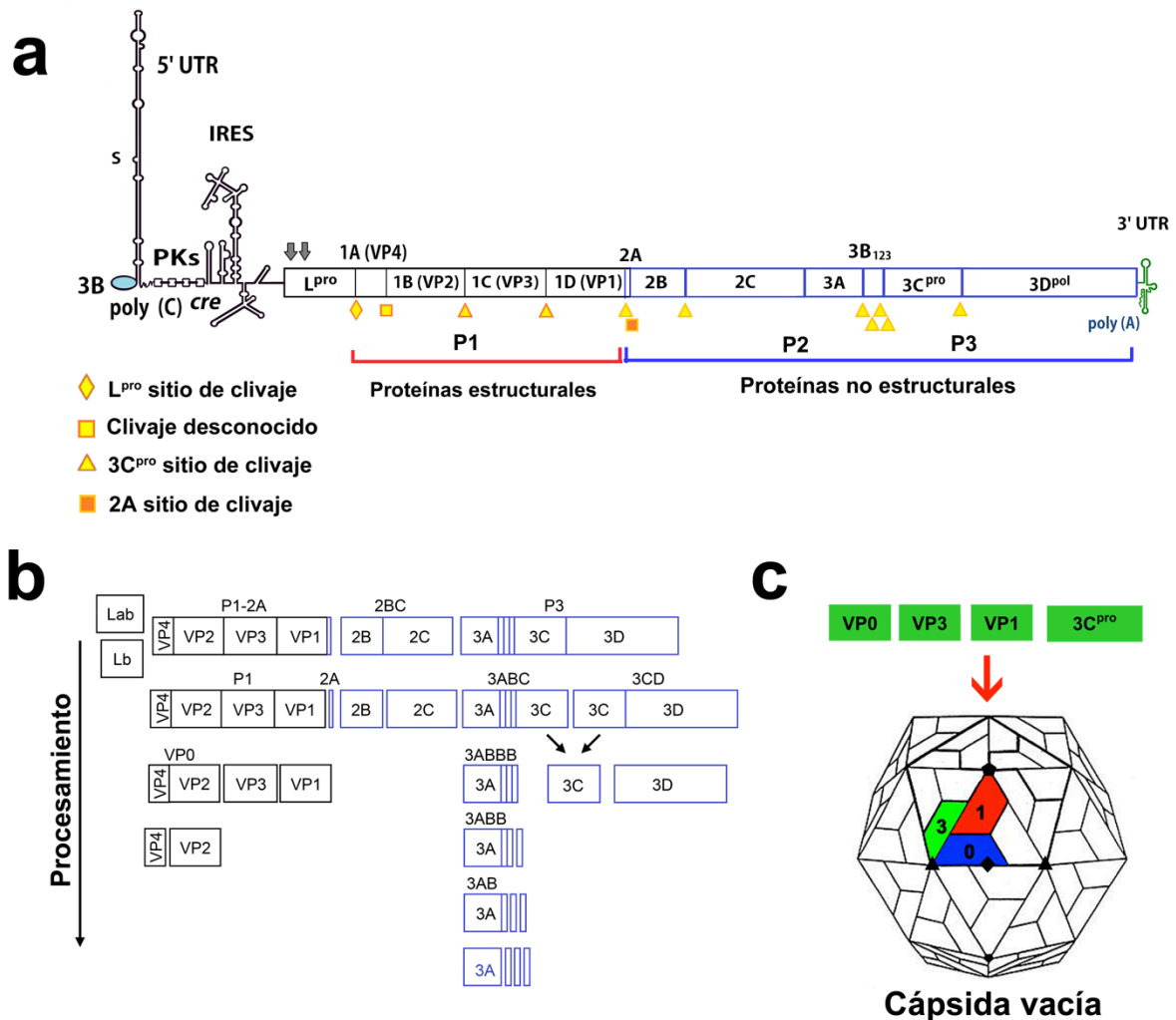
### **1.3. El virus de la fiebre aftosa**

#### **1.3.1. Organización del genoma y proteínas de VFA**

El VFA pertenece al género aftovirus de la familia *Picornaviridae*, y como tal posee un genoma ARN de cadena sencilla y de polaridad positiva, y carece de envuelta (**Figura 1**) (Belsham, 1993; Racaniello, 2001; Sobrino *et al.*, 2001; Sobrino y Domingo, 2004).

El VFA fue el primer virus aislado entre los causantes de enfermedad en animales. En 1898, Loeffler y Frosch demostraron que la FA era transmitida por un agente infeccioso filtrable (Domingo *et al.*, 1990). Se han descrito siete serotipos distintos para VFA (A, O, C, Asia 1, SAT1, SAT2 y SAT3), más de 65 subtipos y numerosas variantes antigénicas (Pereira, 1976; Mateu *et al.*, 1988; Longjam *et al.*, 2011). Esta grandísima diversidad

antigénica es un reflejo de la alta variabilidad genética del VFA y constituye uno de los principales obstáculos para el control de la enfermedad por vacunación (Domingo *et al.*, 1990; Barteling y Woortmeyer, 1987; Domingo y Holland, 1992; Sobrino y Domingo 2004).



**Figura 1. Organización del genoma de VFA, procesamiento proteolítico de la poliproteína viral y regiones codificantes necesarias para el ensamblaje de la cápsida.** (a) Esquema de la organización del ARN genómico. Las regiones codificantes se representan en cajas, y se identifican las proteínas estructurales y no estructurales. Se indican además los elementos funcionales del genoma, incluyendo la región no codificante 5' (5'UTR), la proteína 3B (VPg) unida al extremo 5', el tramo poliC, la estructura de pseudonudo (*pseudoknot*), el elemento de replicación que actúa en *cis* (*cre*), el sitio interno de entrada al ribosoma (IRES), el 3'UTR y el tramo poliA. Los diferentes símbolos en amarillo identifican los puntos de procesamiento de la poliproteína, y las proteasas responsables, según el código indicado en la misma figura. (b) Esquema del procesamiento de la poliproteína en poliproteínas precursoras y proteínas maduras. (c) Ensamblaje de la cápsida a partir de P1-2A procesada en VP0, VP3 y VP1 por la proteasa 3C (3C<sup>Pro</sup>). Adaptado de Grubman y Baxt, 2004; Gubman, 2005 y Ryan *et al.*, 2004.

El VFA de referencia empleado en nuestro laboratorio es el C-S8c1, un clon biológico obtenido a partir de un virus proveniente de un cerdo enfermo, aislado en Sta. Pau, Girona, en 1970 (virus C-Sta Pau Spain/1970) (Sobrino *et al.*, 1983). Pertenece al subtipo europeo C1 dentro del serotipo C. El genoma del VFA C-S8c1 (**Figura 1a**) tiene 8115 nucleótidos de longitud, sin contar los tramos homopoliméricos de policitidilato, poli(C) y poliadenilato, poli(A), que son heterogéneos en longitud (Escarmís *et al.*, 1992, 1996; Toja *et al.*, 1999). Se divide en una región central que contiene un único marco de lectura abierta entre los nucleótidos 1039 y 8023, que codifica a una poliproteína de 2328 aminoácidos que es procesada por proteasas virales durante el ciclo de infección y dos regiones más cortas no codificantes situadas a los extremos de la molécula de ARN, que incluyen elementos reguladores con complejas estructuras secundarias y terciarias.

Las región 5' no codificante (5'UTR) comprende a los primeros 1038 nucleótidos del genoma. Esta región tiene un papel importante en la replicación de VFA y en ella se han identificado los siguientes elementos (**Figura 1a**): fragmento S, el tramo poliC, *pseudoknot* (estructura terciaria de tipo pseudonudo), un elemento replicativo que actúa en *cis* (*cre*) y el sitio de entrada interna del ribosoma (IRES). El fragmento S (367 nucleótidos) está implicado en interacciones con factores celulares y en interacciones ARN/ARN con el extremo 3' (Serrano *et al.*, 2006). Inmediatamente después de esta región se encuentra un tramo de poliC de longitud variable (entre 100 y 400 nucleótidos), su función en la replicación se desconoce, pero algunos estudios en poliovirus han mostrado una asociación con factores del huésped, con la proteína de unión poli(rC) (PCBP), y con el extremo 5' del genoma (Gamarnik y Andino, 1997). Después se encuentra el elemento *cre*, esencial para la replicación de los picornavirus, que contiene un motivo conservado AAACA que funciona como molde para la uridilación de 3B (Nayak *et al.*, 2006). La región IRES está muy estructurada y es la responsable de la traducción del ARN independiente de *cap* (Fernández-Miragall *et al.*, 2009; Martínez-Salas *et al.*, 2008). La región 3' UTR (**Figura 1a**) contiene dos *stem loops* denominados SL1 y SL2, seguidos de un tramo de poliA, típico de ARN mensajeros celulares. El poliA interviene en el inicio de la síntesis de ARN de polaridad negativa y su eliminación afecta la infectividad del ARN de VFA (Sáiz *et al.*, 2001). El poliA estimula la traducción del ARN viral dependiente del IRES (López de Quinto *et al.*, 2002) y está implicado en la circularización del genoma, mediante interacciones con la región 5' UTR (Serrano *et al.*, 2006). Ambas regiones interaccionan con diferentes proteínas celulares (Pacheco *et al.*, 2008; Rodríguez Pulido *et al.*, 2007).

La lectura del ARN puede comenzar en cada uno de los codones AUG funcionales, situados inmediatamente después del IRES y separados entre sí por 84 nucleótidos (Flint *et al.*, 2004; Martínez-Salas *et al.*, 2002). A medida que la poliproteína es traducida, se generan los distintos precursores y proteínas maduras mediante procesamiento proteolítico, que llevan a cabo las proteasas virales (**Figura 1b**, ver Ryan *et al.*, 2004). La poliproteína está dividida en cuatro regiones, que desde el extremo N-terminal al C-terminal, se denominan como sigue a continuación, L, P1, P2, P3. Las regiones L, P2 y P3 codifican precursores y proteínas maduras no estructurales, mientras que la región P1 codifica para las proteínas estructurales que componen la cápsida del virión.

La región L (“leader”) codifica para dos formas alternativas, las proteínas Lab (201 aminoácidos) y Lb (173 aminoácidos), resultado del inicio de la traducción en cada uno de los dos tripletes AUG funcionales del genoma viral (Devaney *et al.*, 1988; Cao *et al.*, 1995; Piccone *et al.*, 1995). L es una proteasa activa en *cis* y *trans*, que cataliza su propia separación de la poliproteína e inicia la proteólisis del factor eIF4F de iniciación de la traducción dependiente de *cap*, lo que contribuye a una parada de la síntesis de proteínas celulares en las células infectadas (Devaney *et al.*, 1988; Kirchweger *et al.*, 1994; Glaser y Skern, 2000). Se ha demostrado que L tiene un papel crítico en la patogénesis de VFA, en su ausencia la región codificante es atenuada *in vitro*, debido a la supresión del interferón  $\alpha/\beta$  (Brown *et al.*, 1996; Chinsangaram *et al.*, 1999). Recientemente, se ha descrito que inhibe la inducción de la traducción de varios genes celulares, incluyendo interferón  $\beta$ , al regulador de la activación de células T normales y secretadas (RANTES) y del factor de necrosis tumoral  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). A su vez, participa en la degradación de la proteína celular, PABP (Rodríguez Pulido *et al.*, 2007), del factor de transcripción NF- $\kappa$ B y en la inhibición de la síntesis de interferones de tipo I (de Los Santos *et al.*, 2006; de Los Santos *et al.*, 2007; de los Santos *et al.*, 2009).

La región P1 (**Figura 1a**) codifica las proteínas estructurales VP1, VP2, VP3 y VP4 (también denominadas como 1D, 1B, 1C y 1A, respectivamente) que forman la cápsida del virus (**Figura 1c**) (Acharya *et al.*, 1989; Lea *et al.*, 1994). VP1, VP2 y VP3 forman la estructura básica de la cápsida, mientras que VP4 es un polipéptido corto que se encuentra en una conformación extendida sobre la superficie interna de la cápsida (ver descripción más detallada en el numeral 1.3.2).

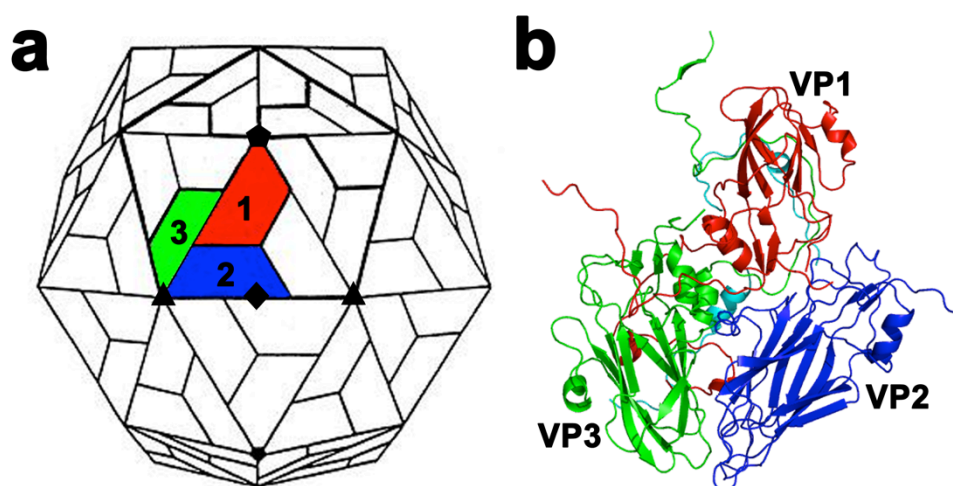
La región P2 (**Figura 1a**) codifica las proteínas no estructurales 2A, 2B y 2C. El péptido 2A, es un péptido de 16 aminoácidos, tiene actividad proteasa y cataliza en *cis* la escisión del péptido P1-2A de 2BC, mediante un proceso de parada y reiniciación del ribosoma (Vakharia *et al.*, 1987; de Felipe *et al.*, 2003; de Felipe y Ryan, 2004). La proteína 2B ha sido asociada en VFA al bloqueo de secreción de proteínas junto con 2C. La proteína 2C está implicada en replicación del ARN y podría inducir la proliferación de vesículas de membranas (Moffat *et al.*, 2007).

La región P3 (**Figura 1a**) codifica las proteínas no estructurales 3A, 3B, 3C y 3D. En otros picornavirus 3A participa en la síntesis del ARN viral (Takeda *et al.*, 1986; Gromeier *et al.*, 1999), en el anclaje a membrana del complejo de replicación (Xiang *et al.*, 1998), en el efecto citopático y en la inhibición de la secreción de proteínas (Doedens y Kirkegaard, 1995; Lin *et al.*, 2009). 3B (VPg) está unida covalentemente al extremo 5' del ARN genómico del virus y está implicada en la iniciación de la síntesis de ARN y probablemente también en la encapsidación (Ferrer-Orta *et al.*, 2006). Por otro lado, 3C (23 KDa) es una serín proteasa, encargada de clivaje en *cis* y *trans* del procesamiento de la poliproteína (Vakharia, 1987; Bablanian y Grubman, 1993; Dougherty y Semler, 1993). La proteasa 3C es muy inestable en células infectadas, aunque se han presentado altos niveles de expresión en bacterias, los cuales han permitido su cristalización y caracterización estructural (Chernaia *et al.*, 1993; Matthews *et al.*, 1994). 3C también es capaz de romper los factores de iniciación de la traducción eIF4A y eIF4GI (Belsham *et al.*, 2000). 3D es la ARN polimerasa dependiente de ARN (RpRd) encargada de la replicación del virus (replicasa viral), contiene la triada catalítica DDD (aminoácidos 240, 338 y 339) típica de las replicasas de virus de ARN de polaridad positiva (Hansen *et al.*, 1997).

### **1.3.2. Estructura molecular y antigénica de la cápsida de VFA, y reconocimiento de receptores celulares**

La estructura tridimensional de los diferentes serotipos de VFA, incluido el virus de referencia C-S8c1 utilizado en este estudio, ha sido resuelta mediante cristalografía de rayos X, revelando un gran similitud conformacional entre serotipos (Acharya *et al.*, 1989; Lea *et al.*, 1994; Curry *et al.*, 1996). La cápsida esférica de VFA presenta una estructura icosaédrica pseudo T=3 y mide unos ~30 nm de diámetro, de acuerdo a mediciones

realizadas por equilibrio de sedimentación y rayos X. El diámetro aparente observado mediante microscopia electrónica puede variar entre 24 y 30 nm (Racaniello, 2001). La cápsida está compuesta por 60 copias de cada una de las 4 proteínas estructurales: VP1 (1D), VP2 (1B), VP3 (1C) y VP4 (1A) (**Figura 2a**). Las tres primeras proteínas (~ 23 - 24 kDa) forman la estructura básica de la cápsida y comparten un plegamiento similar en forma de barril  $\beta$  con 8 cadenas  $\beta$  antiparalelas que se denominan B, I, D, G, C, H, E, F, y que están conectadas entre sí por bucles de longitud variable que se designan con las dos letras correspondientes a las cadenas que unen. La proteína VP4 (~ 9 kDa) está localizada en la superficie interna de la cápsida, con su extremo N-terminal unido covalentemente a un residuo de ácido mirístico (Belsham *et al.*, 1991; Racaniello, 2001; Racaniello, 2007). La proteína VP4 madura resulta del procesamiento proteolítico del precursor VP0 en VP2 + VP4, que se produce una vez ensamblada la cápsida (Knipe *et al.*, 1997).



**Figura 2. Cápsida de VFA y protómero biológico.** (a) Representación esquemática de la estructura cuaternaria de la cápsida de VFA. Se indican ejes de simetría quaternaria (pentágono), ternaria (triángulo) y binaria (óvalo). Las líneas gruesas delimitan un pentámero y los cinco protómeros que lo componen. Las proteínas que componen un protómero se indican en colores: VP1 (1, rojo), VP2 (2, azul), VP3 (3, verde). VP4 es interna. (b) Diagrama de cintas de la estructura molecular de un protómero biológico en la cápsida de VFA (Lea *et al.*, 1994). El código de colores es el mismo que para el apartado (a).

El protómero biológico (coeficiente de sedimentación 5S) está constituido, en el virión maduro, por una molécula de cada proteína de la cápsida (VP1, VP2, VP3 y VP4, **Figura 2b**). Cinco protómeros se asocian formando un pentámero (coeficiente de sedimentación 12S), y doce pentámeros se unen para formar la cápsida. En cada pentámero, los cinco protómeros de cada pentámero se relacionan entre sí mediante un eje

de simetría quinaria alrededor del cual se disponen cinco copias de VP1 (**Figura 2a**). La cápsida vacía presenta un coeficiente de sedimentación de 75S, y el virión formado por la cápsida y la molécula de ARN genómico presenta un coeficiente de sedimentación de 140S y una masa de aproximadamente 7,8 Md (Acharya *et al.*, 1989; Racaniello, 2001; Grubman y Baxt, 2004).

Algunos de los bucles de las proteínas de la cápsida del VFA se encuentran expuestos al exterior e interaccionan con anticuerpos. El bucle G-H de la proteína VP1 (aminoácidos 140-160) muestra una gran movilidad en bisagra sobre la superficie de la cápsida y contiene uno de los principales determinantes antigénicos del VFA, denominado sitio A (revisado en Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004). Multitud de mutaciones de escape a la neutralización por anticuerpos monoclonales ocurren en esta región genómica (Mateu *et al.*, 1989; Mateu 1995; Perales *et al.*, 2005). El bucle G-H de VP1 en virus de serotipo C como C-S8c1 presenta múltiples epítomos continuos solapantes que muestran distinto grado de conservación entre aislados naturales (Mateu *et al.*, 1988, 1989, 1990; Martínez *et al.*, 1992; Mateu, 1995). Otros sitios identificados en VFA C-S8c1 son el sitio C (formado por epítomos continuos localizados en el extremo carboxi-terminal de VP1) y el sitio D, un complejo formado por múltiples epítomos discontinuos parcialmente solapantes (Lea *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1994, 1998; Mateu, 1995).

El sitio A del serotipo C de VFA comprende los aminoácidos 1136-1150 (136-150 de VP1). El sitio A incluye un motivo altamente conservado Arg-Gly-Asp (RGD, aminoácidos 1141-1143) situado en la zona más expuesta del bucle G-H de VP1 (Verdaguer *et al.*, 1995, 1999; Hewat *et al.*, 1997; Sobrino y Domingo 2004). El motivo RGD y otros residuos vecinos en el sitio A tienen una doble función esencial en el ciclo vital del virus, actúan en el reconocimiento de receptores celulares y en la interacción con anticuerpos neutralizantes (Verdaguer *et al.*, 1994; Mateu *et al.*, 1996; Mateu y Verdaguer, 2004).

En contraste al sitio antigénico A, el sitio D está formado por epítomos discontinuos e implica varios bucles de VP1 (subsitio D1), VP2 (subsitio D2) y VP3 (subsitio D3) en cada protómero de la cápsida (Lea *et al.*, 1994; Mateu 1995, Mateu *et al.*, 1998; Mateu y Verdaguer, 2004). Comparando aislados virales naturales y pases seriados de cultivos infectados con VFA se ha encontrado que los residuos que conforman el sitio D del serotipo



C de VFA son más conservados que los aminoácidos implicados en el sitio antigénico A (Mateu *et al.*, 1994; Holguín *et al.*, 1997).

Se ha establecido que las proteínas de adhesión actúan como receptores de VFA pertenecen a la familia de las integrinas, y se encuentran en la superficie de muchos tipos celulares. De 24 integrinas identificadas, 8 reconocen el motivo RGD en el bucle G-H de VP1 de VFA, y  $\alpha\beta 3$ ,  $\alpha\beta 1$ ,  $\alpha\beta 6$ ,  $\alpha\beta 8$  y  $\alpha 5\beta 1$  se han identificado como los principales receptores de este virus (Fox *et al.*, 1989; Rieder *et al.*, 1993; Jackson *et al.*, 2002; Sa-Carvalho *et al.*, 1997; Arzt *et al.*, 2011). Existen evidencias de que la integrina  $\alpha\beta 6$  actúa como receptor principal *in vivo* (Monaghan *et al.*, 2005). Una estimación indicó que a cada célula podrían unirse en torno a  $10^3 - 10^4$  partículas de VFA (Baxt y Bachrach, 1980). Este dato es consistente con una observación más reciente que indica, asumiendo una cifra conservativa, la presencia de unas  $10^3$  moléculas de integrina-  $\alpha$  que podrían unirse a VFA (Benedetto *et al.*, 2006). En aislados de VFA multiplicados en cultivos celulares el motivo RGD puede hacerse prescindible, lo que indica que estas variantes pueden utilizar otros mecanismos de reconocimiento celular (Martínez *et al.*, 1997; Baranowski *et al.*, 2000). Se han descrito otros receptores, como heparán sulfato (HS), relacionado con la adquisición mutaciones expuestas en la cápsida que confieren cargas positivas (Baranowski *et al.*, 1998; Jackson *et al.*, 1996; Sá-Carvalho *et al.*, 1997; Fry *et al.*, 1999b; Arzt *et al.*, 2011). La inoculación de altas dosis de virus que utilizan HS en ganado provocaron lesiones clínicas, pero los viriones recuperados podrían sólo utilizar a un receptor de integrina y no el receptor HS, sugiriendo que la unión HS podría no tener un papel en la patogénesis *in vivo* (Arzt *et al.*, 2011). El VFA puede utilizar receptores diferentes a HS e integrinas (Baranowski *et al.*, 2000; Zhao *et al.*, 2003). Varios estudios han mostrado que VFA puede infectar células en cultivo mediante el reconocimiento del receptor Fc (FcR, receptor de la fracción Fc de las inmunoglobulinas) de una manera dependiente de anticuerpo, aunque, este mecanismo de entrada no ha sido corroborado *in vivo* (Mason *et al.*, 1993; Baxt y Mason, 1995; Arzt *et al.*, 2011).



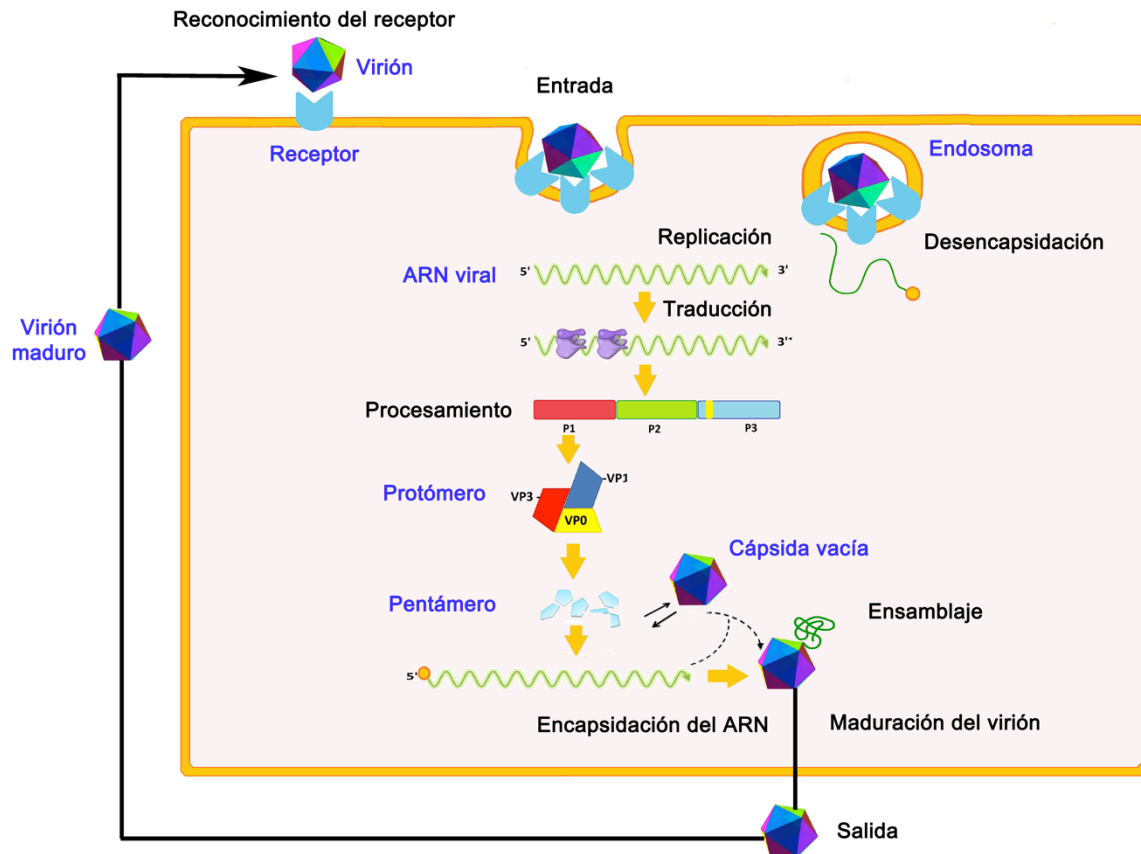
### 1.3.3. Ensamblaje y desensamblaje del virus de VFA y sensibilidad de la cápsida a pH ácido

La **Figura 3** muestra un esquema del ciclo replicativo de VFA. Dados los objetivos del presente trabajo, nos centraremos en comentar sólo algunas etapas en este ciclo, que incluyen el ensamblaje de la cápsida, la encapsidación del ARN de cadena positiva, el procesamiento proteolítico de VP0 a VP2 y VP4 para formar el virión maduro, y la desencapsidación del virión tras la entrada en una nueva célula hospedadora.

**Ensamblaje.** La morfogénesis de VFA y de picornavirus en general es poco conocida; la mayoría de estudios se ha realizado con enterovirus (virus de la poliomielitis, PV) y con el rinovirus humano (HRV), aunque la evidencia disponible indica una similitud entre estos virus y VFA en lo referente al mecanismo de ensamblaje (revisado en Racaniello *et al* 2001; Grubman y Baxt, 2004; Fry *et al.*, 2005). El plegamiento de cada dominio de la poliproteína P1 ocurre probablemente de modo co-traducciona. P1 no procesada de VFA se pliega, seguramente, en una estructura (protómero inmaduro libre) similar a la del protómero maduro ya que el protómero inmaduro es reconocido por los mismos anticuerpos que reconocen epítomos discontinuos en los protómeros maduros que forman el virión de VFA. El procesamiento de P1 plegada en VP0, VP3 y VP1 por la proteasa 3C implica una reorganización de los extremos N- y C-terminales. Cinco protómeros procesados se asocian para formar un pentámero, y doce pentámeros se asocian para formar la cápsida inmadura (**Figura 3**).

En células infectadas con picornavirus se han identificado intermediarios de ensamblaje que incluyen protómeros, pentámeros, cápsidas vacías en las que VP0 no ha sido procesada (Grubman *et al.*, 1985), y pro-viriones (partículas inmaduras no infecciosas, en las cuales VP0 no ha sido procesada, pero que contienen ARN vírico (Guttman y Baltimore, 1977; Lee *et al.*, 1993)). Se ha demostrado que estos pro-viriones se producen durante la replicación de algunos picornavirus, pero no se han observado en células infectadas por VFA. No obstante, Knipe *et al.*, (1997), encontró que en células transfectadas con VFA con mutaciones en el sitio de procesamiento de VP0 se produjeron viriones no infecciosos (coeficiente de sedimentación 140S), en los que VP0 no había sido procesada, presentando características similares a la de los pro-viriones observados para

otros picornavirus. Además, estos proviriones de VFA eran capaces de unirse al receptor celular y presentaron sensibilidad a pH ácido, de modo similar al virus infeccioso.



**Figura 3. Ciclo biológico para VFA.** Se indican las diferentes etapas principales del ciclo, en negrita, y algunos componentes víricos o celulares en azul. Para una descripción de los pasos estudiados en este trabajo, ver texto. Adaptado de Racaniello, 2001.

Hasta el momento, se han propuesto dos modelos para la encapsidación en picornavirus. En el primero se propone que los pentámeros se ensamblan primero para formar las cápsidas vacías, y a continuación se internaliza el ARN para formar el provirión. En el segundo, se propone que los pentámeros interactúan directamente con el ARN/VPg, formando directamente el pro-virión mediante un mecanismo de condensación. Estudios con poliovirus (Verlinden *et al.*, 2000), favorecen la hipótesis mediante la cual las cápsidas vacías podrían ser un producto defectuoso o servir como un repositorio de pentámeros.

El paso final en la morfogénesis de los picornavirus es el procesamiento proteolítico de VP0 en el provirión para dar VP4 y VP2 (Jacobson *et al.*, 1968; Arnold *et al.*, 1987;

Hogle *et al.*, 1985). Esta reacción ocurre mediante un mecanismo autocatalítico en presencia del ARN viral, convirtiendo los 85 residuos en el extremo N-terminal de VP0 en VP4, y los residuos restantes en VP2, aunque en el virión maduro pueden quedar unas muy pocas copias de VP0 sin procesar (Grubman y Baxt, 2004; Fry *et al.*, 2005). Se ha demostrado que en la cápsida vacía de VFA VP0 puede sufrir un procesamiento aberrante, sugiriendo que el ARN viral es estrictamente necesario para que ocurra el procesamiento correcto (Curry *et al.*, 1995; Curry *et al.*, 1997). Una histidina conservada (His 2145 en el serotipo A) podría mediar el clivaje autocatalítico de VP0 en VFA (Curry *et al.*, 1997), como se ha predicho para la histidina 2195, homóloga en los poliovirus. El procesamiento de VP0 parece reforzar las interacciones entre las subunidades de la cápsida, haciendo a ésta más estable a pH neutro y, además, aumentaría ligeramente la sensibilidad a pH del virión (Curry *et al.*, 1995; Ellard *et al.*, 1999).

**Desensamblaje.** Tras el reconocimiento del virión de VFA por receptores celulares de tipo integrina, ocurre su internalización (**Figura 3**) (Heuser y Anderson, 1989, Hansen *et al.*, 1993; Berryman *et al.*, 2005; O'Donnell *et al.*, 2005; Martín-Acebes *et al.*, 2007; Tuthill *et al.*, 2010). Diferentes estudios proponen que los mecanismos de internalización de VFA están determinados por la naturaleza del receptor. Los estudios de entrada viral mediante análisis bioquímicos y por microscopía confocal, han mostrado que el VFA (serotipos O, A y C) que entra a las células mediante la unión a integrinas (subunidad  $\alpha v$ ), es internalizado en el endosoma por una ruta de endocitosis mediada por clatrin (O'Donnell *et al.*, 2005; Berryman *et al.*, 2005; Martín-Acebes *et al.*, 2007). Con VFA de serotipo C se ha demostrado que esta ruta requiere de colesterol en la membrana plasmática, pero no de la función de *lipid-rafts/caveolas* (Martín-Acebes *et al.*, 2007; Martín-Acebes *et al.*, 2009). El mecanismo de desencapsidación de VFA no está clarificado, pero parece diferente del de otros picornavirus como poliovirus y rinovirus Oliveira *et al.*, 1999; Tuthill *et al.*, 2007; Bergelson, 2008; Fuchs y Blaas, 2010; Tuthill *et al.*, 2010). *In vitro* es posible inducir la disociación de viriones de VFA en pentámeros y la consecuente liberación del ARN mediante una ligera disminución en el pH, o mediante calentamiento moderado (Bachrach, 1968, 1977; Rueckert, 1996; Racaniello, 2001). *In vivo*, se cree que el virión de VFA pierde completamente su integridad en los endosomas: la cápsida se disocia en pentámeros a causa de la acidificación en los endosomas, y se libera la proteína VP4 y el ARN genómico (Vásquez *et al.*, 1979; Dubra *et al.*, 1982; Carrillo *et al.*, 1984; Baxt, 1987; Berryman *et al.*, 2005; Johns *et al.*, 2009; Tuthill *et al.*, 2010). La proteína VP4 es

altamente hidrofóbica y está miristoilada, podría unirse a la membrana del endosoma y facilitar la liberación del ARN al citosol (Belsham *et al.*, 1991; Danthi *et al.*, 2003; Davis *et al.*, 2008; Knipe *et al.*, 1997).

**Sensibilidad de la cápsida a pH ácido.** A diferencia de lo que ocurre con otros picornavirus, las cápsidas de VFA son extremadamente sensibles a la acidificación y se disocian completamente en subunidades pentaméricas en condiciones sólo muy ligeramente ácidas (pH inferior a 6,8) (Brown y Cartwright, 1961; Brown, 1972; Newman *et al.*, 1973; Curry *et al.*, 1995; van Vlijmen *et al.*, 1998; Smyth y Martin, 2002; Mahy, 2005). Se ha propuesto que esta inestabilidad de la cápsidas de VFA a pH ligeramente ácido podría deberse darse a la protonación de algunas histidinas localizadas cerca (a menos de 15 Å) de las interfases entre subunidades pentaméricas (van Vlijmen *et al.*, 1998). Por tanto, estas histidinas actuarían como sensores de pH para desencadenar el desensamblaje de la cápsida mediado por acidificación (Acharya *et al.*, 1989; van Vlijmen *et al.*, 1998). Se han propuesto como especialmente importantes para este mecanismo los residuos H3142 y H3145 en serotipo A, equivalentes a H3141 y H3144 en serotipo O, y a H3140 y H3143 en serotipo C (Curry *et al.*, 1995; Ellard *et al.*, 1999; van Vlijmen *et al.*, 1998).

Aunque el papel de la acidificación endosomal se ha relacionado con la desencapsidación desde hace años (Baxt, 1987; Carrillo *et al.*, 1984; Carrillo *et al.*, 1985), los determinantes moleculares que median la desencapsidación a pH ácido aún no se han determinado. El aislamiento y caracterización de mutantes que muestren alteraciones en los mecanismos de encapsidación podrían proveer una herramienta útil para el estudio de este proceso. Se han obtenido, algunos mutantes de VFA más resistentes a la acidificación (Twomey *et al.*, 1995). Más recientemente, el grupo del Prof. Francisco Sobrino ha aislado y caracterizado variantes con un aumento a la labilidad en condiciones ácidas (Martín-Acebes *et al.*, 2010) y han obtenido varios mutantes con un aumento en la resistencia a la inactivación a pH ácido (Martín-Acebes *et al.*, 2011). La estabilidad de estos variantes frente a la disociación en subunidades ha sido investigada como una pequeña parte del presente estudio, en colaboración con el grupo del Prof. Sobrino.

### **1.4. Vacunas contra la fiebre aftosa**

#### **1.4.1. Vacunas en uso y vacunas experimentales alternativas**

Hasta la fecha, las vacunas comerciales utilizadas contra la FA están basadas en preparaciones de viriones completos inactivados químicamente. Las vacunas son producidas a gran escala mediante infección de células susceptibles con VFA. La inactivación se lleva a cabo mediante un agente químico apropiado, en muchos casos etilenimina binaria (BEI). La vacuna se prepara a partir de virus inactivado, generalmente utilizando aceites minerales como adyuvantes, para la inmunización de ganado bovino, porcino, y ovino (revisado por Doel, 2003; Grubman y Baxt, 2004; Paton *et al.*, 2009; Rodríguez y Grubman, 2009; Rodríguez y Gay, 2011; Li y Liu, 2011; Zhang *et al.*, 2011). Un número de países han establecido bancos de vacunas, en los cuales se ha almacenado antígeno concentrado en nitrógeno líquido. Los antígenos guardados en estas condiciones son estables durante un largo período de tiempo de acuerdo a la formulación de la vacuna. Estos bancos contienen virus vacunales de diferentes serotipos y pueden proporcionar a los países miembros una fuente casi inmediata de la vacuna (Grubman y Baxt, 2004; Hegde *et al.*, 2009; Parida, 2009).

A pesar de su eficacia, las vacunas actuales contra FA presentan varias limitaciones e inconvenientes muy importantes, algunos de los cuales se describen a continuación: i) para prevenir el escape del virus se requiere de instalaciones de alta contención para la producción de las vacunas; a pesar de todas las medidas de seguridad, existe un claro riesgo de escape de las plantas de producción; ii) muchas de las preparaciones usadas para la vacuna se concentran a partir de sobrenadantes de células infectadas con VFA y, dependiendo del tipo de manufacturación, pueden contener cantidades significativas de proteínas no estructurales virales como contaminantes. Por tanto, los animales vacunados desarrollan respuesta frente a anticuerpos tanto para las proteínas contaminantes, como para las proteínas estructurales virales, impidiendo distinguir con facilidad entre animales vacunados y animales infectados o convalecientes; iii) la inactivación del virus puede ser incompleta, con lo que la vacuna puede ser una fuente de infección potencial; iv) la vacuna no induce una rápida protección frente al desafío por inoculación directa o contacto directo; por lo tanto, se presenta una ventana de susceptibilidad de los animales vacunados antes de la inducción de la respuesta inmune adaptativa; v) debido a la existencia de

múltiples variantes antigénicas circulantes de VFA, a la ausencia de reacción cruzada entre los diferentes serotipos, y a la protección incompleta entre subtipos, es necesario utilizar vacunas derivadas de diferentes serotipos y variantes que se deben actualizar dependiendo la zona geográfica, aumentando los costos de la producción y los riesgos derivados de una falta de protección completa; vi) la vacuna es inestable a una temperatura de 2-8°C (Kitching *et al.*, 2007; Parida, 2009) y mucho más a temperaturas mayores. La causa de esta inestabilidad se debe a la termolabilidad intrínseca de los viriones de VFA, que se disocian fácilmente a pentámeros, los cuales presentan una inmunogenicidad severamente reducida (Cartwright, 1962; Brown y Cartwright, 1961; Cartwright *et al.*, 1980). Por lo tanto, las vacunas requieren ser almacenadas en nitrógeno líquido, y es necesario establecer una costosa cadena de frío desde el punto de fabricación hasta al punto de aplicación. Las rupturas de las cadenas de frío son frecuentes en muchos de los países en los que la FA es endémica, debido a que no poseen la infraestructura necesaria, y a las condiciones climatológicas desfavorables; la pérdida de inmunogenicidad tras la ruptura de la cadena de frío no es detectada, y la vacunación resulta ineficaz en tales casos (Grubman y Baxt, 2004; Hegde *et al.*, 2009; Parida, 2009; Li y Liu, 2011; Rodríguez y Gay, 2011).

Se han realizado y continúan realizándose diversas investigaciones con el fin de desarrollar vacunas modificadas o nuevas vacunas contra la FA que mejoren su seguridad, composición, y/o estabilidad térmica. Se han evaluado una serie nuevas vacunas experimentales contra la FA que tratan de minimizar alguno(s) de los problemas mencionados, y que incluyen: i) vacunas basadas en proteínas recombinantes; ii) vacunas basadas en péptidos sintéticos; iii) vacunas ADN; iv) vacunas basadas en virus atenuados; v) vacunas basadas en cápsidas vacías o VLPs (revisado por Grubman, 1985; Grubman y Baxt, 2004; Rodríguez y Grubman, 2009; Rodríguez y Gay, 2011; Li y Liu, 2011).

Hasta el momento las únicas vacunas oficialmente autorizadas frente a la FA se basan en viriones inactivados, a pesar de los inconvenientes que presentan y que ya han sido mencionados. Ninguna las vacunas experimentales que se están desarrollando cumplen todavía con los requisitos necesarios para su comercialización. En la **Tabla 1** se han resumido algunas de las ventajas y desventajas que, en principio, ofrecerían estas nuevas vacunas experimentales, en las se ha hecho énfasis en la seguridad de la producción, la seguridad de los animales vacunados, duración de la respuesta inmune, y

factibilidad en la diferenciación de los animales vacunados de los infectados (Zhang *et al.*, 2011).

**Tabla 1. Ventajas y desventajas potenciales de nuevas vacunas experimentales para la FA.**

Vacunas experimentales	Seguridad producción	Seguridad animales vacunados	Duración respuesta inmune	Diferenciación animales infectados de vacunados
Vacunas de subunidades (VLPs o cápsidas vacías)	Sí	Sí	Normal	Sí
Vacunas ADN	Intermedia	Recombinación	Largo tiempo	Sí
Vacunas atenuadas	Sí	Reversión	Largo tiempo	Sí
Vacunas péptidos sintéticos	Sí	Sí	Corta	Sí

Adaptado de Zhang *et al.*, 2011.

### 1.4.2. Cápsidas vacías como posibles vacunas contra la fiebre aftosa

Las vacunas basadas en cápsidas vacías presentan gran interés potencial, ya que mantendrían intactas la especificidad antigénica y la inmunogenicidad conseguidas con las vacunas actuales formuladas a base de viriones completos, pero evitarían la necesidad de crecer y manipular el virus infeccioso, lo que eliminaría totalmente el riesgo de un escape de virus o de infección causada por una inactivación insuficiente durante la producción de la vacuna (Beck y Strohmaier, 1987; Suttmöller *et al.*, 2003). Además, los animales inoculados con este tipo de vacunas podrían fácilmente distinguirse de los infectados o convalecientes, mediante el uso de ensayos diagnósticos específicos para las proteínas no estructurales, cuyos genes no están presentes en los plásmidos recombinantes utilizados para la producción de las cápsidas vacías (Grubman y Baxt *et al.*, 2004).

La obtención de cápsidas vacías de VFA involucra: i) la clonación molecular de las regiones del genoma viral necesarias para la síntesis, el procesamiento y el ensamblaje de las proteínas estructurales (es decir, las regiones codificantes para la poliproteína P1-2A y la proteasa 3C); ii) la expresión de estas proteínas en células apropiadas; iii) el autoensamblaje de las cápsidas en estas células; iv) la purificación de las cápsidas



producidas (Grubman *et al.*, 1985; Roosien *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991; Belsham *et al.*, 1991; Grubman *et al.*, 1993). Las cápsidas vacías de VFA así producidas son inmunogénicamente indistinguibles del virión natural (Rowlands *et al.*, 1975; Grubman, 1984; Grubman *et al.*, 1988).

Se ha demostrado que las cápsidas vacías pueden ser sintetizadas por una gran variedad de sistemas de expresión, entre ellos *E.coli* (Grubman *et al.*, 1993; Lewis *et al.*, 1991), en plantas transgénicas (Dus Santos *et al.*, 2005), levaduras (Balamurugan *et al.*, 2005), células de mamífero utilizando vectores adenovirales (Mayr *et al.*, 1999; Mayr *et al.*, 2001; Moraes *et al.*, 2003; Moraes *et al.*, 2002; Pacheco *et al.*, 2005), o el sistema de expresión basado en virus vaccinia recombinante (Abrams *et al.*, 1995; Sanz-Parra *et al.*, 1998; Berinstein *et al.*, 2000), o en células de insecto utilizando el sistema de expresión basado en baculovirus (Roosien *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991; Saiz, *et al.*, 1994; Li *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009; Cao *et al.*, 2010). Adicionalmente, un número de grupos han usado otros sistemas para expresar la cápsida en presencia o ausencia de las regiones codificantes de la 3C, en algunos casos suplementados con citoquinas como potenciales coadyuvantes utilizando otros sistemas de expresión, tales como, en el virus de la pseudo-rabia (Li *et al.*, 2008) o el virus recombinante de la viruela aviar (Ma *et al.*, 2008b).

El proceso de síntesis de cápsidas vacías de VFA ha resultado en general muy ineficaz, dando lugar en los mejores casos a cantidades muy pequeñas de cápsidas ensambladas. Las cápsidas no han sido en general purificadas, o sólo parcialmente purificadas mediante centrifugación a través de un colchón o gradiente de sacarosa o similar. Las escasas cápsidas obtenidas se han detectado generalmente sólo mediante electroforesis, análisis inmunoquímicos y, muy raramente, mediante microscopía electrónica de preparaciones poco satisfactorias. La inmunogenicidad de estas preparaciones no ha resultado en general adecuada (Grubman y Baxt, 2004; Oem *et al.*, 2007; Li *et al.*, 2008). Una razón que explica en parte la baja producción de cápsidas vacías de VFA en diferentes sistemas de expresión es la gran toxicidad de la proteasa 3C requerida para el procesamiento de P1 (Thomas *et al.*, 1983; Lewis *et al.*, 1991; Martínez-Salas y Domingo., 1995). Pero además, otra razón que puede explicar en parte la baja producción de cápsidas vacías y la pobre inmunogenicidad de estas preparaciones es que las cápsidas vacías de VFA parecen ser aún menos estables que los viriones, a causa de la ausencia del ARN vírico (Curry *et al.*, 1995).



### 1.5. Diseño de variantes termoestables de VFA

En nuestro laboratorio venimos explorando la posibilidad de termoestabilizar partículas víricas de VFA mediante la introducción de interacciones potencialmente estabilizantes entre subunidades de la cápsida, o la eliminación de interacciones desestabilizantes en la misma. Desde el punto de vista aplicado, la termoestabilización genética de viriones de VFA permitiría desarrollar vacunas basadas en viriones inactivados químicamente como las actuales, pero menos dependientes del correcto funcionamiento de la cadena de frío. La termoestabilización genética de cápsidas vacías recombinantes de VFA podría favorecer su desarrollo como vacunas alternativas contra la FA que no implicaran riesgos de infección y permitieran la distinción entre animales vacunados e infectados, pero manteniendo una termoestabilidad que fuera, al menos, similar a la de las vacunas clásicas. A continuación describimos los resultados obtenidos hasta el inicio de esta tesis en lo referente al diseño y caracterización de variantes de VFA más estables frente a la disociación térmica.

El conocimiento de la estructura tridimensional de VFA, incluyendo la de C-S8c1, nos permitió realizar un estudio en el que se sustituyó sistemáticamente a alanina cada una de las 42 cadenas laterales por protómero que establecen interacciones entre pentámeros vecinos en la cápsida de VFA. Los resultados demostraron que la gran mayoría de estos residuos, y las interacciones que establecen, tienen un papel crítico en el ciclo viral. Sólo un pequeño número de residuos en las interfases entre pentámeros admitieron la mutación sin un efecto apreciable sobre la infectividad (Mateo *et al*, 2003). Estos resultados y la estructura de VFA se usaron como una guía para el diseño de substituciones de aminoácidos que no afectaran severamente a la infectividad del virión pero permitieran establecer nuevas interacciones entre pentámeros, incluyendo puentes disulfuros o interacciones electrostáticas entre residuos cargados. El mantenimiento de la infectividad del virión era esencial no sólo para poder analizar el resultado de la mutación, sino porque el virión debe mantener su infectividad durante la producción de vacuna por el método actualmente utilizado. Dada su relación con algunos de los objetivos del presente trabajo, a continuación se hace una descripción detallada de los resultados obtenidos, que permitieron el desarrollo inicial de esta tesis doctoral.

En primer lugar, se utilizaron programas bioinformáticos para elegir, considerando también las restricciones funcionales encontradas, los lugares donde sustituir aminoácidos por cisteínas que pudieran formar puentes disulfuro entre pentámeros. Se construyeron ocho dobles mutantes (E2011C/G3150C; T2023C/A3145C; N2114C/G3192C; K2002C/E2006C; K2003C/E2006C; E2006C/D2012C; E2007C/T2008C; T2007C/D2012C). Los resultados mostraron que seis de estos mutantes de cisteína presentaban una drástica reducción en la infectividad con respecto al virus parental. En contraste, los mutantes T2023C/A3145C y E2007C/T2008C mostraron una infectividad normal. El análisis electroforético sugirió que el puente disulfuro podría haberse formado en el mutante T2023C/A3145C pero no en el mutante T2007C/T2008C (Mateo *et al.*, 2008; Luna, 2010).

Por otro lado, se realizó una aproximación similar para introducir diferentes interacciones de carácter iónico entre pentámeros. Se construyeron dos dobles mutantes (T2053D/Q2057K y Y2200H/I3189D) en los que las substituciones introducidas podrían formar una nueva interacción iónica interpentamérica. En un tercer variante se introdujo la mutación D3069E con el fin de alargar la cadena lateral, permitiendo la formación de un puente salino con la lisina 2198 en VP2. Finalmente, se construyeron dos mutantes adicionales, en los que se mutagenizó el residuo A2065 por His o Lys, permitiendo crear una interacción electrostática de corto alcance o un puente salino interpentamérico con E3137. Cuando se determinó la infectividad de cada uno de estos mutantes, se encontró que los mutantes T2053D/Q2057K y Y2200H/I3189D, presentaban una infectividad severamente reducida. En cambio, las mutaciones A2065H y A2065K no causaron una reducción significativa de infectividad. Cuando se analizó la progenie vírica, las mutaciones introducidas se mantuvieron y no se encontraron mutaciones adicionales en la cápsida completa. Por otra parte, la mutación D3069 fue en sí misma letal, pero en un caso, durante la replicación del genoma viral se fijó una segunda mutación, T2188A, que permitió la recuperación de viriones infectivos que se diferencian del parental exclusivamente en estas dos mutaciones.

Los mutantes viables contruidos más prometedores resultaron, por tanto, ser T2023C/A3145C, D3069E/T2188A y A2065H. El análisis de la tasa de disociación en subunidades de viriones purificados demostró que los dos últimos mutantes presentan una termoestabilidad muy incrementada con respecto al virión parental natural, C-S8c1.

Ambos mutantes resultaron, además, genéticamente estables (Mateo *et al.*, 2008). Como parte del presente trabajo, hemos continuado y ampliado grandemente nuestros estudios sobre posibles aproximaciones para la estabilización de partículas víricas de VFA, e investigado los mecanismos moleculares de su estabilización.

### **1.6. Estudio sistemático de la respuesta genética de diferentes variantes virales a la introducción de mutaciones deletéreas en la cápsida de VFA**

Los análisis de estructura y función muestran que la substitución de la gran mayoría de aminoácidos en la cápsida de VFA y otros virus sin envuelta, aún en bucles expuestos sin función conocida, disminuye significativamente la producción viral, o al menos afecta desfavorablemente a la eficacia viral (ver, p.ej., Mateo *et al.*, 2003; Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004; Reguera *et al.*, 2004). Sin embargo, muchos de estos efectos deletéreos pueden neutralizarse mediante la fijación de mutaciones compensatorias en la cápsida, que contribuyen a restablecer la infectividad y eficacia biológica (ver, p.ej., Mateo y Mateu 2007, Luna *et al.*, 2009).

Nuestro grupo ha realizado un estudio acerca de la dinámica de aparición en la cápsida de VFA de mutaciones capaces de compensar el efecto deletéreo de mutaciones introducidas a propósito en las interfases entre pentámeros. Desde el punto de vista de este trabajo, razonamos que los efectos deletéreos de mutaciones de residuos interfásicos podrían estar relacionados con problemas de ensamblaje o desensamblaje o la estabilidad de la partícula. El análisis de las mutaciones capaces de restaurar la infectividad en estos casos y de sus mecanismos de acción podría contribuir a entender estos procesos, y a sugerir modos de estabilizar partículas de VFA y de virus en general. Los resultados hasta el momento (Luna *et al.*, 2009) han revelado una compleja dinámica de mutaciones compensatorias muy diversas y fijadas con una alta frecuencia, muchas de ellas concentradas en unos pocos residuos de la cápsida, que actúan como “puntos calientes” (*hot spots*) para la fijación de mutaciones compensatorias. Como parte del presente trabajo, hemos investigado los mecanismos moleculares de un caso frecuente de compensación, formado por una mutación deletérea en la cápsida de VFA, que implica la eliminación de una carga positiva cerca de la interfase entre pentámeros, y una mutación secundaria

compensatoria en un *hot spot* situado muy cerca de la mutación primaria, que implica la introducción de una carga positiva.

## **1.7. Aglomeración macromolecular y compuestos antivirales**

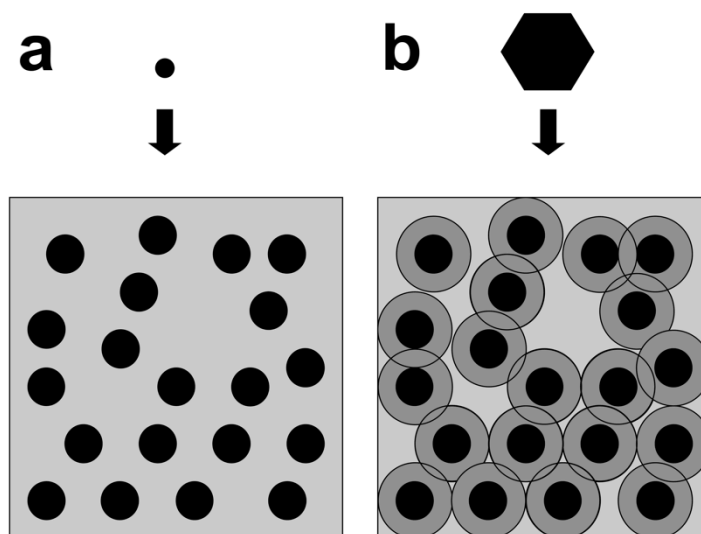
Desde el punto de vista aplicado, los estudios básicos de nuestro grupo sobre reconocimiento molecular relacionado con el ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de partículas víricas se orientan no sólo a la mejora de vacunas, sino también al desarrollo de antivirales. Muchos de los fármacos antivirales licenciados o en estudio son pequeñas moléculas que actúan uniéndose a una macromolécula viral, una macromolécula celular o un complejo macromolecular, provocando la inhibición en la asociación con el ligando natural que es requerido para la progresión en el ciclo viral (De Clercq, 2004; Greene *et al.*, 2008). Una estrategia antiviral que está recibiendo cada vez mayor atención es la inhibición del reconocimiento del virus por la célula huésped. Fármacos que actúan de este modo ya se han licenciado para quimioterapia contra la infección por el VIH-1 (Melby y Westby, 2009). Otros agentes antivirales, incluyendo moléculas orgánicas pequeñas y péptidos, se encuentran en diferentes etapas de desarrollo (p.ej., Jones *et al.*, 2006; Hall *et al.*, 2008; Porotto *et al.*, 2007; Vitiello *et al.*, 2009; Matsubara *et al.*, 2009; Melby y Westby *et al.*, 2009; Nicol *et al.*, 2012).

Los estudios iniciales para determinar el efecto de potenciales compuestos antivirales en el proceso de reconocimiento macromolecular se llevan a cabo en soluciones relativamente diluidas en sistemas *in vitro* o *ex vivo* (cultivo de células). Sin embargo, en los compartimientos intracelulares o en los fluidos extracelulares, donde estos compuestos deben actuar *in vivo*, la concentración total de macromoléculas es extremadamente elevada. En estas condiciones, se ha predicho que el efecto inhibitorio de pequeñas moléculas sobre procesos de reconocimiento entre macromoléculas (incluyendo el reconocimiento entre virus y receptor celular, o el ensamblaje de partículas víricas) se podría ver significativamente reducido.

La concentración total de las macromoléculas en los compartimientos intracelulares y en los fluidos extracelulares suele ser de 100 mg/ml o superior, con un rango que varía de ~80 mg/ml en el plasma sanguíneo a ~300 mg/ml o más en células bacterianas. Estas

condiciones conducen a efectos de volumen excluido derivados de la impenetrabilidad mutua de las macromoléculas solubles, un fenómeno conocido como aglomeración macromolecular (*macromolecular crowding*) (Minton, 1983; Minton, 1993; Zimmerman y Minton, 1993; Minton, 1998; Minton, 2001; Zhou *et al.*, 2008). En una solución aglomerada, la reactividad de un soluto dado está determinada por el número de moléculas de soluto por unidad de volumen disponible (no total). Asimismo, en un medio aglomerado, la actividad química de un soluto (“concentración efectiva”) será más elevada que en solución diluida. En general, la aglomeración macromolecular favorece las reacciones que conllevan a una reducción en el volumen excluido total, como la formación de complejos macromoleculares solubles o agregados insolubles, el plegamiento de las proteínas, y la unión de las macromoléculas a diferentes sitios en la superficie celular. Muchos de los efectos propuestos en la teoría de aglomeración macromolecular se han observado experimentalmente usando una gran variedad de sistemas que implican a diversas proteínas y/o sus componentes celulares (para algunos ejemplos, consultar la revisión de Zhou *et al.*, 2008).

Se ha propuesto que la magnitud del efecto de aglomeración depende en gran medida del tamaño relativo, la forma y la concentración de las macromoléculas (Zimmerman y Minton, 1993; Minton, 1993; Zhou *et al.*, 2008). Por ejemplo, la aglomeración macromolecular incrementará la actividad termodinámica de las macromoléculas alargadas y/o grandes frente a las macromoléculas pequeñas; este efecto podría provocar un aumento significativo en la unión de los ligandos grandes y/o alargados a un receptor en relación a los ligandos pequeños y compactos (Minton, 1993). Por tanto, la teoría de aglomeración macromolecular predice que concentraciones elevadas de una macromolécula inerte (actuando como agente de aglomeración), puede favorecer la unión de un ligando de gran tamaño (por ejemplo, una partícula viral) para fijarse a un sitio de unión (por ejemplo, un receptor en una célula), con respecto a la unión de molécula pequeña (por ejemplo, un péptido o pequeña molécula orgánica) para el mismo sitio de unión (**Figura 4**, Minton, 1993; Minton, 2001).



**Figura 4.** Efecto de la aglomeración macromolecular en el volumen disponible para una molécula en función de su tamaño. El cuadrado define un contenedor (por ejemplo, una célula) en el que existe una concentración muy elevada de macromoléculas inertes (esferas de color negro). En este ejemplo, éstas ocupan aproximadamente el 30% del volumen disponible. **(a)** cuando se introduce una molécula pequeña (esfera pequeña), ésta puede acceder virtualmente a casi un 70% del volumen remanente (en color gris claro). **(b)** cuando se introduce una molécula de gran tamaño (hexágono) el volumen disponible (en color gris claro) es mucho más limitado, debido a efectos estéricos. Las zonas en color gris medio son accesibles a la molécula pequeña (esfera pequeña en **(a)**) pero no a la grande (hexágono en **(b)**). Adaptado de Minton, 2001.

Si los supuestos implícitos y las predicciones de este análisis se aplican bajo condiciones de infección reales, la actividad antiviral de pequeñas moléculas sobre los procesos de asociación que implican macromoléculas víricas podría verse considerablemente reducida o abolida en los medios fisiológicos donde la infección viral ocurre *in vivo*. En la última parte de esta tesis doctoral utilizamos como modelo la inhibición por péptidos sintéticos del reconocimiento entre VFA y receptores en la superficie de células susceptibles para evaluar experimentalmente, por primera vez, esta importante predicción de la teoría de la aglomeración macromolecular.



## **OBJETIVOS**





## **2. OBJETIVOS**

Dentro de la línea general de investigación de nuestro grupo sobre ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de virus, en esta tesis de doctorado nos planteamos seis objetivos concretos, que se enuncian a continuación. La justificación de cada uno de estos objetivos, en función de los antecedentes descritos en la Introducción, se realiza en el apartado de Resultados correspondiente a cada objetivo.

1. Caracterización bioquímica e inmunoquímica de viriones de VFA modificados racionalmente para incrementar su estabilidad frente a la disociación térmica.
2. Investigación de las bases moleculares del efecto termoestabilizante de las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A en el virión de VFA.
3. Construcción y caracterización de cápsidas vacías recombinantes de VFA modificadas mediante ingeniería de proteínas para incrementar su estabilidad frente a la disociación térmica.
4. Investigación de las bases moleculares de la compensación del efecto letal de una mutación en la interfase entre pentámeros mediante una mutación compensatoria en una posición “*hot spot*” en la cápsida de VFA.
5. Análisis de la importancia funcional de los residuos localizados en las interfases entre subunidades protoméricas de la cápsida de VFA.
6. Evaluación del efecto de la aglomeración macromolecular en la actividad de moléculas inhibidoras del reconocimiento entre un virus y su receptor celular.



## **MATERIALES Y MÉTODOS**



### 3. MATERIALES Y METODOS

#### 3.1. Disoluciones y tampones

- **Tampón PBS:** 1,5 mM  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ ; 8,1 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ ; 137 mM NaCl; 2,7 mM KCl, pH= 7,4.
  - **Solución Tripsina-EDTA:** 0,5 mg/ml tripsina (DIFCO); 0,016% etilendiaminotetraacetato sódico (EDTA, Merck); 0,0015% rojo fenol (Merck); 1,12 mM glucosa (Merck) disueltos en PBS pH=7,4.
  - **Tampón TE:** 10 mM Tris-HCl pH=8,0 (Sigma), 1 mM EDTA.
  - **Tampón TAE:** 40 mM Tris-acetato sódico pH=8,0, 1 mM EDTA.
  - **Tampón TBE:** 90 mM Tris-acetato sódico pH=8,0, 2 mM EDTA.
  - **Tampón TNE:** 50 mM Tris-HCl pH 7,5; 5 mM EDTA; 100 mM NaCl.
  - **Tampón de transferencia:** 30,3 g Trizma Base (Sigma), 144,1 g glicina (Merck) y agua desionizada hasta un volumen final de 1 litro.
  - **Medio Líquido LB:** 10 g NaCl, 10 g triptona (Pronadisa), 5 g extracto de levadura (Becton Dickinson) y agua desionizada hasta un volumen final de 1 litro. Ajustado a pH 7.0.
  - **Medio sólido LB-Agar:** 10 g NaCl, 10 g triptona, 5 g extracto de levadura, 20 g agar y agua desionizada hasta un volumen final de 1 litro.
  - **Tampón de electroporación:** 21 mM Hepes pH 7,05 (Sigma), 137 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,7 mM  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ , 6 mM glucosa.
  - **Tampón de lisis:** 20 mM Tris-HCl pH 8.0, 125 mM NaCl, y 0,5% NP-40 (Sigma).
- Las sales utilizadas en este trabajo (si no se indica casa comercial) son de Merck.

#### 3.2. Células eucarióticas y su manipulación

##### 3.2.1. Células BHK-21c2 y su cultivo

Se empleó para todos los ensayos la línea celular BHK-21c2 (clon 2). Las células BHK-21c2 son fibroblastos de riñón de hámster, y provienen de un clon obtenido mediante

dilución límite por de la Torre *et al.*, (1988). Las células se cultivaron hasta confluencia en medio Eagle modificado por Dulbecco (DMEM, Gibco), al que se añadieron aminoácidos no esenciales (0,44 mM de L-alanina; L-asparagina, L-ácido aspártico, L-ácido glutámico y L-prolina (Sigma), cada uno de ellos a una concentración final de 0,4 mM), 50 mg/ml de gentamicina (Sigma) y 0,00002% de parahidroxibenzoato de butilo (Sigma) (denominado DMEM completo), suplementado con 5% de suero fetal bovino (SFB, Gibco). Las células se incubaron a 37°C en atmósfera con 7% de CO<sub>2</sub> y 98% de humedad relativa (Domingo *et al.*, 1980), condiciones que se siguieron en todo este trabajo. En general, las células fueron cultivadas en placas Petri (Falcon) o botellas de plástico de 175 cm<sup>2</sup> (B175, Nunc). Para la realización de un nuevo pase celular o para diferentes ensayos, las células confluentes se separaron de la placa por tratamiento con solución de tripsina-EDTA previamente calentada a 37°C, se incubaron durante 2-3 min a temperatura ambiente (t.a.), se resuspendieron en DMEM con 5% de SFB y se sembraron en placas Petri, botellas o placas multipocillo a la densidad celular deseada.

### **3.2.2. Descongelación de células BHK-21c2**

Las células BHK-21c2 contenidas en criotubos (Nunc) y almacenadas en nitrógeno líquido se descongelaron rápidamente a 37°C, luego fueron transferidas a un tubo de plástico (Falcon) de 15 ml que contenía 9 ml de DMEM completo calentado a 37°C. Las células se centrifugaron a 1,000 r.p.m. (180 g) durante 5 min a t.a. en una centrífuga de mesa (*Rotina 46R*, Hettich). El sobrenadante fue eliminado completamente y el pellet celular se disgregó mediante suave agitación del tubo. Se añadieron 2,5 ml de DMEM completo con 10% de SFB para resuspender las células, y a la suspensión celular obtenida se agregaron 12,5 ml de DMEM completo con 10% de SFB, agitando suavemente. La suspensión celular se añadió a una placa Petri de 100 mm de diámetro (P100) y las células se incubaron a 37°C.

### **3.2.3. Congelación de células BHK-21c2**

Se utilizaron células no completamente confluentes (aproximadamente un 90%), que fueron separadas por tratamiento con solución de tripsina-EDTA. Una vez obtenida la

suspensión celular ( $10^6$  células/ml por cada criotubo), se agregó una mezcla de 90% de SFB y 10% de dimetil sulfóxido (DMSO, Sigma). La suspensión se agitó brevemente, se distribuyó en criotubos y se congeló lentamente a  $-70^{\circ}\text{C}$ . Al cabo de dos días las células se transfirieron a nitrógeno líquido.

### **3.3. Virus e infecciones**

#### **3.3.1. Virus utilizados**

**VFA C-S8c1.** Utilizado como virus de referencia, es un clon biológico obtenido mediante tres aislamientos sucesivos de placa a partir de monocapas de células BHK-21 infectadas con una muestra proveniente de un cerdo enfermo en Sta. Pau, Girona en 1970 (Sobrino *et al.*, 1983). Pertenece al subtipo europeo C<sub>1</sub> dentro del serotipo C. El virus parental y todos los virus mutantes utilizados en este trabajo se obtuvieron mediante transcripción *in vitro* del plásmido recombinante infeccioso pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 (numeral 3.5). La secuencia de aminoácidos de la cápsida del virus parental utilizado en esta tesis se muestra en la **Figura 5**, la cual corresponde con la indicada en Escarmís *et al.*, (1999).

**Virus vaccinia recombinante vT7f3.** Expresa la RNA polimerasa de T7, y ha sido adaptado previamente a células BHK-21c2 (Martínez-Salas *et al.*, 1993). Fue proporcionado por la Prof. Encarnación Martínez Salas (Centro de Biología Molecular “Severo Ochoa”, Madrid). Se utilizó para la obtención de cápsidas vacías de VFA mediante el sistema de expresión basado en vaccinia (numeral 3.13).

#### **3.3.2. Amplificación de VFA en células BHK-21c2**

Los virus obtenidos en los diferentes ensayos de electroporación con ARN viral infeccioso (numeral 3.8.2) fueron amplificados mediante la infección de monocapas de células BHK-21c2 (confluentes al 90%) a elevada multiplicidad de infección (m.d.i.). Después de una hora de adsorción a  $37^{\circ}\text{C}$ , las monocapas se lavaron con DMEM completo sin SFB, y se agregó DMEM completo con 2% de SFB. El sobrenadante de infección se recogió (junto con las células remanentes), cuando se observó efecto citopático (e.c.)



completo, y se congeló a -70°C. Posteriormente, se descongeló (para efectuar la lisis de las células remanentes) y se centrifugó a 2,500 r.p.m. en centrífuga de mesa (*Rotina 46R*, Hettich) durante 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante, se hicieron alícuotas y éstas se congelaron y almacenaron a -70°C.

### **3.3.3. Titulación de VFA mediante plaqueo**

El método de plaqueo seguido para la titulación de VFA sobre células BHK-21c2 en medio de agar semisólido se ha descrito previamente (Domingo *et al.*, 1980; Sobrino *et al.*, 1983; Baranowski *et al.*, 1998). Brevemente, se utilizaron diluciones crecientes de virus para infectar monocapas de células cercanas a la confluencia, cultivadas en placas Petri de 60 mm de diámetro (P60). Después de una hora de adsorción del virus a 37°C, las monocapas se lavaron dos veces con DMEM completo sin SFB, se añadió 0,5% de agar semisólido en medio DMEM completo con 1% de SFB y 1% de dietilaminoetil(DEAE)-dextrano, y se incubaron durante 24 h más a 37°C. Las células se fijaron con 2% de formaldehído y se tiñeron con una solución de 2% de cristal violeta y 2% de formaldehído. El título viral se determinó por duplicado o triplicado mediante conteo de placas de lisis.

### **3.3.4. Amplificación del virus vaccinia vT7f3 en células BHK-21c2**

Para la amplificación de vT7f3 se utilizaron células BHK-21c2, sembradas en 2 P100 (80-90% de confluencia). Las células se lavaron con DMEM completo sin suero, precalentado a t.a. Se Añadieron a cada P100 100 µl del virus vaccinia vT7f3 y 500 µl de DMEM completo sin suero, para un volumen final de 600 µl de inóculo viral. Las células se incubaron durante 1 h a 37°C. Se retiró el inóculo viral y se agregaron 7 ml de DMEM completo con 5% de SFB. A las 20-24 h.p.i, las células se observaron bajo el microscopio invertido para verificar la aparición de sincitios. Entre las 40 y 48 h.p.i. se recogió el sobrenadante conteniendo el virus, se congeló y se almacenó a -80°C.

<b>VP4</b>		
1		60
GAGQSSPATGSQNQSGNTGSIINNYMQQYQNSMDTNLGDNAISGGSNEGSTDTTSTHTT		
1		60
61	85	
NTQNNDWFSKLASSAFSGLFGALLA		
61	85	

<b>VP2</b>		
1		60
DKKTEETTLLLEDRIILTTRNGHTTSTTQSSVGVTFGYATAEDSTSGPNTSGLETRVHQAER		
1		60
61		120
FFKMALFDWVPSQNFGHMHKVLPHEPKGVYGLVKSAYMRNGWDVEVTAVGNQFNGGC		
61		120
121		180
LLVALVPEMGDISDREKYQLTLYPHQFINPRTNMTAHITVPYGVNRYDQYKQHRPWTLV		
121		180
181	218	
VMVVAPLTNTAGAQQIKVYANIAPTNVHVAGELPSKE		
181	218	

<b>VP3</b>		
1		60
GIFPVACSDGYGNMVTDPKTADPAYGKVYNPPRTALPGRFTNYLDVAEACPTFLMFENV		
1		60
61		120
PYVSTRTDGQRLAKFDVSLAAKHMSNTYLAGLAQYYTQYTGTLNLHFMFTGPTDAKARY		
61		121
121		180
MVAYVPPGMDAPDNPEEAHCHAEWDTGLNSKFTFSIPYISAADYAYTASHEAETTCVQ		
122		181
181	219	
GWVCVYQITHGKADADALVVSASAGKDFELRLPVDARQQ		
182	220	

<b>VP1</b>		
1		60
TTTTGESADPVTTTVENYGGETQVQRRHHTDVAFVLDRFVKVTVSDNQHTLDVMQAHKDN		
1		60
61		120
IVGALLRAATYYFSDLEIAVTHTGKLTWVPNGAPVSALNNTNPTAYHKGPVTRLALPYT		
61		120
121		180
APHRVLATAYTGTTTYTASARGDLAHLTTTHARHLPTSFNFGAVKAETITELLVRMKRAE		
121		184
181	209	
LYCPRPILPIQPTGDRHKQPLVAPAKQLL		
184	213	

**Figura 5. Secuencia de aminoácidos de la cápsida de C-S8c1.** La secuencia de las proteínas de la cápsida del virus empleada en esta tesis doctoral corresponde con la indicada en Escarmís *et al.*, (1999). La secuencia correspondiente a cada proteína se indica en un color diferente: rojo (VP4), azul (VP2), violeta (VP3) y verde (VP1). La numeración en la parte superior e inferior de la secuencia coincide con la utilizada por Escarmís *et al.*, (1999) y por Lea *et al.*, (1994), respectivamente. Las posiciones 138, 139, 140 y 144 de VP1 y 59 de VP3 no corresponden a ningún aminoácido, ya que el serotipo C-S8c1 presenta deleciones con respecto al virus O<sub>1</sub>BFS, que estos últimos autores tomaron como referencia para la numeración de los residuos.

### **3.3.5. Titulación del virus vT7f3 mediante ensayo de luciferasa**

La titulación de preparaciones de virus vT7f3 se realizó mediante un ensayo de luciferasa previamente reportado (Martínez-Salas *et al.*, 1989). Para ello, se sembraron células BHK-21c2 en pocillos de una placa de 24 pocillos (M24, Nunc). Luego, las células se infectaron con 1-2  $\mu$ l de virus vT7f3 en 200  $\mu$ l de DMEM completo sin SFB, y se incubaron a 37°C durante 1 h.

Treinta minutos antes de finalizar el tiempo de adsorción del virus, se preparó la mezcla de transfección, la cual contenía (por pocillo de una placa M24) 0,6  $\mu$ l del reactivo de transfección FuGENE 6 (Roche) disuelto en 19,4  $\mu$ l de DMEM sin antimicóticos y antibióticos; esta solución se incubó por 10 min a t.a. y luego se agregaron 0,3  $\mu$ g del plásmido T7-IRES-pBiC (ver numeral 3.5) como se describió previamente (Martínez-Salas *et al.*, 1993). La mezcla se incubó por 15 min adicionales a t.a.

Tras finalizar la incubación con el inóculo viral, se realizaron dos lavados con DMEM sin suero y se agregó 200  $\mu$ l de DMEM sin suero y 20  $\mu$ l de mezcla de transfección anterior, lentamente, sobre las células infectadas, y éstas se incubaron durante 4 h a 37°C. Luego se agregaron 200  $\mu$ l de DMEM con 10% de SFB, y las células se incubaron durante varias horas más, hasta un total de 16-20 horas post-transfección (h.p.t.), en función del grado de formación de sincitios. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se lavaron los pocillos con 0,5 ml de PBS pre-calentado y se agregaron 100  $\mu$ l de tampón de lisis (numeral 3.1) frío por pocillo. Se incubó durante 3 min y se resuspendió el lisado celular. Este se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 min a 4°C, y se recogió el sobrenadante. Para medir la actividad de la luciferasa se tomó 1  $\mu$ l del sobrenadante y se resuspendió en 200  $\mu$ l tampón de reacción [25 mM de gly-glicina glicilglicina (pH 7,8), 15 mM de sulfato de magnesio, 5 mM ATP (pH 7,0) (Sigma), 100  $\mu$ g/ml de albúmina sérica bovina, 1 mM ditiotritol (Sigma)] en un tubo de luminómetro, en presencia de 1 mM de luciferina (Promega). La medición de la emisión de luz se realizó inmediatamente durante 10 segundos de emisión a 25°C usando un luminómetro modelo 2010 (Analytical Luminiscence). Para normalizar las medidas de bioluminiscencia a partir de los lisados celulares se cuantificó la concentración de la proteína mediante el método de Bradford (BioRad). Los valores se expresaron en ULR (unidades relativas de luz) por  $\mu$ g de

proteína. En promedio se obtuvieron  $2 \times 10^6$  unidades de luz producidas a partir de extractos derivados de  $2 \times 10^5$  células. Las unidades de luz y ULR obtenidas en cada ensayo fueron comparadas frente a los valores obtenidos del sobrenadante (1  $\mu$ l, 2  $\mu$ l y 5  $\mu$ l) a partir de lisados celulares obtenidos con un virus vT7f3 stock de referencia previamente titulado que se colocó en paralelo en cada ensayo.

### 3.4. Péptidos sintéticos

Para los ensayos de inhibición del reconocimiento entre VFA y su receptor celular (numeral 3.19) se utilizaron cuatro péptidos, originalmente suministrados por el Prof. David Andreu (Universitat Pompeu Fabra, Barcelona): i) dos péptidos sintéticos solapantes que representan la secuencia central de aminoácidos del bucle G-H en la proteína VP1 de VFA C-S8c1: péptido A15 (residuos 136-150 de VP1: YTASARGDLAHLTTT) y péptido A19 (residuos 138-156 de VP1: ASARGDLAHLTTTHARHLP); ii) el péptido A15<sub>RGE</sub>, una variante inactiva del péptido A15 (YTASARGELAHLTTT), la cual presenta una substitución en el motivo RGD de unión al receptor celular de VFA. iii) el péptido A19 conjugado en múltiples copias a *keyhole limpet hemocyanine* (KLH). El péptido A19-KLH fue dializado inmediatamente antes de usar para eliminar el péptido A19 libre y otros contaminantes de bajo peso molecular. Los péptidos están amidados en su extremo C-terminal, y se usaron disueltos en PBS.

### 3.5. Plásmidos recombinantes

Para la obtención de viriones de VFA (parental y mutantes) se utilizaron los plásmidos pO<sub>1</sub>K/C-S8c1, p3242/C-S8c1, pO<sub>1</sub>K/ $\Delta$ 2292 (Baranowski *et al.*, 1998; Mateo, 2004) (**Figura 6**). El plásmido infeccioso quimérico pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 (**Figura 6b**) se construyó a partir de un clon de ADNc infeccioso derivado del aislado O<sub>1</sub>Kaufbeuren (O<sub>1</sub>K) (Zibert *et al.*, 1990). pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 contiene el ADNc correspondiente a un genoma quimérico de VFA que codifica para las proteínas de la cápsida y la proteína no estructural 2A de C-S8c1, y la proteína 2B y el resto de las proteínas no estructurales del aislado O<sub>1</sub>K. Por tanto, el virión obtenido a partir de este clon infeccioso (utilizado como virus parental

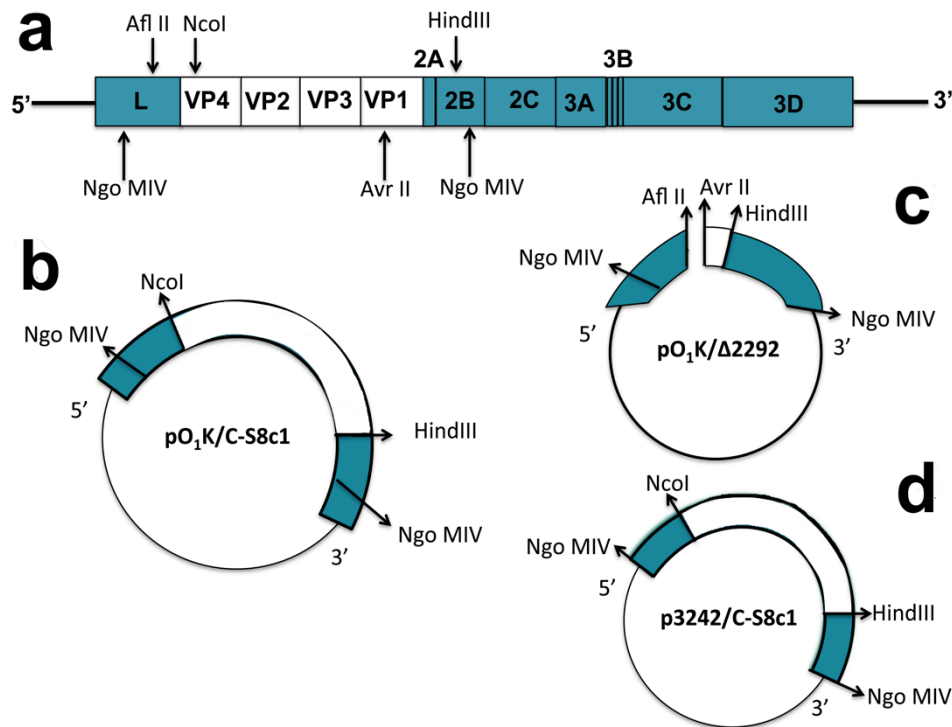
en este trabajo), corresponde enteramente a C-S8c1, aunque su genoma contiene algunas diferencias de nucleótido con respecto al genoma de C-S8c1 en la región que codifica las proteínas no estructurales.

El plásmido p3242/C-S8c1 (**Figura 6d**) deriva de un vector comercial pGEM-5Zf(+), al que se ha insertado un segmento de 3242 p.b. del plásmido pO<sub>1</sub>K/C-S8c1. Este segmento se localiza entre dos sitios de restricción *Ngo*MIV, e incluye la región completa de las proteínas de la cápsida de VFA C-S8c1 (Baranowski *et al.*, 1998). Se utilizó como vector intermediario para la introducción de mutaciones en viriones de VFA.

El plásmido pO<sub>1</sub>K/ $\Delta$ 2292 (**Figura 6c**) reportado por Mateo *et al.*, (2003) corresponde al vector pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 al que le falta un segmento de 2292 p.b. (entre los sitios de restricción *Afl* II y *Avr* II). Este segmento incluye parte de la secuencia de la proteína L junto con toda la secuencia que codifica para las proteínas estructurales (P1), a excepción del último segmento de VP1 a partir de la posición 3757. Sobre este plásmido se introdujo mediante subclonación el segmento de 2292 p.b. conteniendo la mutación deseada, proveniente de la mutagénesis dirigida del plásmido p3242/C-S8c1 (numeral 3.7). Dado que la secuencia de la región que codifica las proteínas estructurales es idéntica entre O<sub>1</sub>K y C-S8c1 desde el sitio *Avr* II, las cápsidas de los viriones mutantes producidos corresponden exactamente con la de C-S8c1, excepto por la presencia de la mutación introducida.

Para la obtención de cápsidas vacías (parental y mutantes) se utilizaron los plásmidos PL1-1 y pSKRH-3C (Belsham *et al.*, 2000), suministrados por el Dr. Graham Belsham (National Veterinary Institute, Universidad Técnica de Dinamarca, Lindholm). El plásmido PL1-1 deriva del vector PGEM4Z e incluye 2193 nt de la P1 de VFA C-S8c1 y los primeros 18 nt de la proteasa 2A. El plásmido pSKRH-3C (Belsham *et al.*, 2000), expresa la proteasa 3C de un aislado de serotipo A<sub>10</sub> de VFA (igualmente activa sobre la poliproteína P1 de C-S8c1), bajo el control de un promotor de T7.

El plásmido pBIC expresa un ARNm bicitrónico de la forma CAT-IRES-Luciferasa, utilizando el sistema de expresión de la ARN polimerasa T7. La región IRES corresponde a la secuencia de C-S8c1. Este plásmido fue utilizado para la titulación de las preparaciones del virus vT7f3 mediante la medición de la actividad de la luciferasa (Martínez-Salas *et al.*, 1993).



**Figura 6.** Esquema de los plásmidos pO<sub>1</sub>K/CS8c1, pO<sub>1</sub>K/Δ2292, p3242/C-S8c1. (a) esquema del genoma de VFA con indicación de algunos sitios de restricción para la cepa O<sub>1</sub>K. (b-d) diagramas de plásmidos utilizados en este trabajo: (b) pO<sub>1</sub>K/CS8c1; (c) pO<sub>1</sub>K/Δ2292; (d) p3242/C-S8c1. En color blanco o verde se representan los segmentos correspondientes al genoma de VFA O<sub>1</sub>K o CS8c1, respectivamente. Se indican algunos sitios de restricción relevantes para este trabajo.

### 3.6. Oligonucleótidos para mutagénesis dirigida, amplificación o secuenciación

Los oligodesoxinucleótidos utilizados para la mutagénesis dirigida de VFA (numeral 3.7) presentan un tamaño de entre 25 y 45 nucleótidos; la mutación se encuentra aproximadamente en la mitad del oligonucleótido, con ~10-15 bases de la secuencia correcta a ambos lados, presentan un contenido de GC mínimo de 40%, y su extremo 3' termina en uno o más nucleótidos G o C. Los oligonucleótidos se obtuvieron de Invitrogen, liofilizados, libres de sales y otros solutos. Se centrifugaron a 12,000 r.p.m. durante 30 segundos a temperatura ambiente en una microfuga (*Mikro 12-24*, Hettich), y se disolvieron en tampón TE pH=8,0 a una concentración final de aproximadamente 200

nmol/ml, estimada a partir de los datos suministrados por la casa comercial. La concentración real se determinó mediante dilución 1/200 en agua y medida de la absorbancia a 260 nm en un espectrofotómetro *UV-1603* (Shimadzu), utilizando para el cálculo el coeficiente de extinción específico. Las soluciones preparadas se almacenaron a -20°C. Los oligonucleótidos mutagénicos utilizados se indican en las [Tabla 2](#), [Tabla 3](#) y [Tabla 4](#). Para la amplificación o secuenciación de segmentos génicos de VFA (numerales 3.10 y 3.11), se utilizaron los oligonucleótidos indicados en la [Tabla 5](#).

### **3.7. Mutagénesis dirigida**

#### **3.7.1. Introducción de mutaciones mediante PCR**

Para la substitución de aminoácidos en el virión o la cápsida vacía recombinante de VFA de C-S8c1 se llevó a cabo una mutagénesis dirigida sobre los plásmidos p3242/C-S8c1 o PL1-1, respectivamente (numeral 3.5), utilizando la técnica de PCR inversa, el *kit QuikChange Site-Directed Mutagenesis* (Stratagene) y los oligonucleótidos mutagénicos que se describen en las [Tablas 2, 3](#) o [4](#) (numeral 3.6). Se siguieron las instrucciones del fabricante, realizando una primera incubación de 30 s a 95°C, seguida de 14 ciclos compuestos por incubaciones de 30 s a 95°C, 1 min a 55°C y 14 min a 68°C, y de una incubación final a 4°C. Luego, la reacción se colocó 2 min en hielo, se añadió 1 µl de *DpnI* (10U/µl, Stratagene) y se incubó durante 1 h a 37°C. Posteriormente se realizó la transformación de células *E.coli* XL1-Blue (Stratagene) o *E.coli* XL-10 Gold (Stratagene) competentes con el producto de la PCR mutagénica tratado con *DpnI*. Para ello, se realizó una mezcla de un 1 µl del producto de reacción y 50 µl de células competentes; la mezcla se incubó en hielo durante 30 min, luego 45 s a 42°C y, finalmente, 2 min en hielo. Las células transformadas se incubaron durante 1 h a 37°C en medio LB, y se sembraron sobre placas Petri en medio sólido LB-agar con ampicilina (100 µg/ml). Las colonias positivas fueron amplificadas en medio líquido con ampicilina a la misma concentración, y se realizó la extracción del ADN plasmídico mediante el *kit Wizard SV Miniprep* (Promega), siguiendo las instrucciones del fabricante. La eficacia del proceso de mutagénesis se determinó siguiendo las instrucciones del fabricante. La presencia de la mutación fue confirmada por secuenciación automática de ADN.



**Tabla 2.** Oligonucleótidos utilizados para la introducción de mutaciones en las interfases interprotómero en el virión de VFA

Residuo <sup>a</sup>	Oligonucleótido <sup>b</sup>	Secuencia 5'→3' <sup>c</sup>
T1050	T1050A-F	GGATAACCAACACGCGCTCGACGTGATGCAGG
	T1050A-R	CCTGCATCACGTCGAGCGCGTGTGGTTATCC
N1060	N1060A-F	GGCACACAAAGACGCGATCGTGGGCGCGC
	N1060A-R	GCGCGCCACGATCGCGTCTTTGTGTGCC
K1085	K1085A-F	CCCACACTGGGGCACTCACATGGGTGCCC
	K1085A-R	GGGCACCCATGTGAGTGCCTCCAGTGTGGG
N1100	N1100A-F	CTGCACTTAACGCAACAACCAATCCCCTGC
	N1100A-R	GCAGTGGGATTGGTTGTGCGTTAAGTGCAG
T1102	T1102A-F	GCACTTAACAACACAGCAATCCCCTGCCTACC
	T1102A-R	GGTAGGCAGTGGGATTGCTGTGTGTGTTAAGTGC
Y1107	Y1107A-F	CCAATCCCCTGCGCGCACAAAGGGCCCG
	Y1107A-R	CCGGGCCCTTGTGCGCGGCAGTGGGATTG
N2047	N2047A-F	CACGTCTGGACCCGCGACATCTGGTCTAGAGACG
	N2047A-R	CGTCTCTAGACCAGATGTGCGCGGTCCAGACGTG
S2049	S2049A-F	GGACCCAATACAGCGGGTCTAGAGACGC
	S2049A-R	GCGTCTCTAGACCCGCTGTATTGGGTCC
L2051	L2051A-F	CCAATACATCTGGTGCGGAGACGCGGTTTCATCAGG
	L2051A-R	CCTGATGAACGCGCGTCTCCGCAACCAGATGTATTGG
Y2100	Y2100A-F	CAAGTCATACGCGGCGATGCGCAATGGCTGG
	Y2100A-R	CCAGCCATTGCGCATCGCCGCGTATGACTTG
R2167	R2167A-F	GGGTGTCAACGCATATGACCAGTACAAACAGC
	R2167A-R	GCTGTTTGTACTGGTCATATGCGTTGACACCC
K2217	K2217A-F	GAGCTCCCCCTCCGCGGAGGGGGATCTTCC
	K2217A-R	GGAAGATCCCCCTCCGCGGAGGGGGAGCTC
N3013	N3013A-F	CTGACGGTTACGGCGCGATGGTGACAACCTGACC
	N3013A-R	GGTCAGTTGTCACCATCGCGCCGTAACCGTCAG
M3014	M3014A-F	GGTTACGGCAACGCCGTGACAACCTGACCCG
	M3014A-R	CGGGTCAGTTGTCACGGCGTTGCCGTAACC
T3016	T3016A-F	CGGCAACATGGTGGCCACTGACCCGAAAACG
	T3016A-R	CGTTTTCGGGCTAGTGGCCACCATGTTGCCG
T3099	T3090A-F	GGCCAGTACTACGCGCAGTACACCGGG
	T3090A-R	CCCGGTGTACTGCGCGTAGTACTGGGCC
Q3100	Q3100A-F	CCAGTACTACACAGCCTACACCGGGACAATCAACC
	Q3100A-R	GGTTGATTGTCCCGGTGTATGCTGTGTAGTACTGG
M3130	M3130A-F	CGTGCCCCCTGGCGCAGACGCACCAGACAACC
	M3130A-R	GTTTGTCTGGTGCGTCTGCGCCAGGGGGCACG
I3143	I3143A-F	GCTGCCCCACTGCGCGCACGCAGAATGGG
	I3143A-R	CCCATTCTGCGTGCGCGCAGTGGGCAGC
Y3169	Y3169A-F	GCTGACTACGCGGCGACCGCGTCCCACG
	Y3169A-R	CGTGGGACGCGGTGCGCGCGTAGTCAGC
V3215	V3215A-F	GCTCCGGCTACCTGCAGACGCTAGACAACAACTACG
	V3215A-R	CGTAGTTTGTGTCTAGCGTCTGCAGGTAGCCGGAGC

<sup>a</sup> Se incluye en la numeración la abreviatura del aminoácido original. Para cada residuo, el primer dígito indica la proteína a la que pertenece (VP1, VP2 o VP3) y los tres últimos se refieren a la posición dentro de la proteína, según la numeración empleada por Lea *et al.*, (1994).

<sup>b</sup> El nombre del oligonucleótido indica el cambio del aminoácido introducido, indicando la orientación del oligonucleótido sobre el molde (F, directa-*forward* o R, inversa-*reverse*).

<sup>c</sup> Se indica la secuencia de nucleótidos con orientación 5' a 3'. El codón mutagenizado se ha subrayado en cada caso.



**Tabla 3.** Oligonucleótidos utilizados para la introducción de mutaciones que alteran la carga electrostática superficial en el virión de VFA.

Residuo <sup>a</sup>	Oligonucleótido <sup>b</sup>	Secuencia 5'→3' <sup>c</sup>
D2068	D2068N-F	CAAAATGGCACTTTTTAACTGGGTTCCCTCAC
	D2068N-R	GTGAGGAACCCAGTTAAAAAGTGCCATTTTG
E2086	E2086Q-F	GGTTGTTCTGCCCCACCA <u>G</u> CCAAAAGACCAGTAC
	E2086Q-R	GTACTGGTCTTTTGGCTGGTGGGGCAGAACCAACC
E2108	E2108Q-F	GGCTGGGACGTCCAA <u>G</u> TGACCGCTGTTG
	E2108Q-R	CAACAGCGGTACCTC <u>G</u> ACGTCCCAGCC
D2106	D2106N-F	GCGCAATGGCTGGA <u>A</u> TGTCGAGGTGACCGC
	D2106N-R	GCGGTCACCTCGACATTCCAGCCATTGCGC
D3069	D3069N-F	GTCTCAACACGAACTA <u>A</u> TGGGCAAAGGCTAC
	D3069N-R	GTAGCCTTTGCCCATTAGTTCGTGTTGAGAC
D3134	D3134N-F	GGCATGGACGCACCA <u>A</u> ATAACCCAGAAGAGGC
	D3134N-R	GCCTCTTCTGGGTTA <u>T</u> TGGTGCGTCCATGCC
E3137	E3137Q-F	GCACCAGACAACCCAC <u>A</u> GAGGCTGCCCAC
	E3137Q-R	GTGGGCAGCCTCCTGTGGGTTGTCTGGTGC
E3138	E3138Q-F	CCAGACAACCCAGAA <u>C</u> AAGCTGCCCACTGC
	E3138Q-R	GCAGTGGGCAGCTTGTCTGGGTTGTCTGG
E3146	E3146Q-F	CTGCATACACGCACAGTGGGACACTGG
	E3146Q-R	CCAGTGTCCCACTGTGCGTGTATGCAG
D3148	D3148N-F	CACGCAGAATGGA <u>A</u> TACTGGTCTGAACCTCC
	D3148N-R	GGAGTTTCAGACCAAGTATTCCATTCTGCGTG
D3195	D3195N-F	CTCACGGCAAGGCA <u>A</u> ATGCCGACGCGCTC
	D3195N-R	GAGCGCGTCGGCATTTCCTTGCCGTGAG

<sup>a</sup> Se incluye en la numeración la abreviatura del aminoácido original. Para cada residuo, el primer dígito indica la proteína a la que pertenece (VP2 o VP3) y los tres últimos se refieren a la posición dentro de la proteína, según la numeración empleada por Lea *et al.*, (1994).

<sup>b</sup> El nombre del oligonucleótido indica el cambio del aminoácido introducido, indicando la orientación del oligonucleótido sobre el molde (F, directa-*forward* o R, inversa-*reverse*). Cuando se construyeron dobles o triples mutantes se utilizó el ADN molde que contenía ya una de las mutaciones, y sobre este se introdujo la segunda mutación.

<sup>c</sup> Se indica la secuencia de nucleótidos con orientación 5' a 3'. El codón mutagenizado se ha subrayado en cada caso.

### 3.7.2. Introducción de mutaciones en el plásmido infeccioso de VFA mediante subclonación

Las mutaciones producidas en p3242/C-S8c1 se introdujeron en el clon infeccioso de VFA como se ha descrito previamente (Mateo *et al.*, 2003; Mateo y Mateu, 2007). Brevemente, p3242/C-S8c1 conteniendo la mutación deseada se digirió con *Afl* y *Avr II*, para obtener un segmento de 2292 p.b. que se insertó como un *cassette* en pO<sub>1</sub>K/Δ2292 (numeral 3.5), dando lugar a un clon infeccioso pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 que contenía la mutación. Este se utilizó para transformar células *E.coli* XL-10 Gold ultracompetentes (Stratagene).

El ADN plasmídico procedente de una colonia, tras la amplificación en medio líquido, fue extraído y purificado mediante el *kit Wizard SV Miniprep* (Promega). La presencia de la mutación y la ausencia de mutaciones acompañantes fueron confirmadas por secuenciación automática de ADN.

**Tabla 4. Oligonucleótidos utilizados para la introducción de mutaciones en la cápsida vacía de VFA.**

Residuo <sup>a</sup>	Oligonucleótido <sup>b</sup>	Secuencia 5'→3' <sup>c</sup>
A2065	A2065H-F A2065H-R	GGCAGAGAGGTTTTTCAAAATGCACCTTTTTGATTGGGTTCC GGAACCCAATCAAAAAGGTGCATTTTGAAAAACCTCTCTGCC
D3069	D3069A-F D3069A-R	CTCAACACGAACTGCCGGGCAAAGGCTAC GTAGCCTTTGCCCGGCAGTTCGTGTTGAG
T2188	T2188A-F T2188A-R	CGCGCCACTCGCCACAAACACAGCAGG CCTGCTGTGTTTGTGGCGAGTGGCGCG
H3141	H3141A-F H3141A-R	GAAGAGGCTGCCGCCTGCATACACGCAG CTGCGTGTATGCAGGCGGCAGCCTCTTC
N2019	N2019H-F N2019H-R	CTCACTACCCGTCATGGGACACGACC GGTCGTGTGCCCATGACGGGTAGTGAG

<sup>a</sup> Se incluye en la numeración la abreviatura del aminoácido original. Para cada residuo, el primer dígito indica la proteína a la que pertenece (VP2 o VP3) y las tres últimas cifras se refieren a la posición dentro de la proteína según la numeración empleada por Lea *et al.*, (1994).

<sup>b</sup> El nombre del oligonucleótido indica el cambio del aminoácido introducido, indicando la orientación del oligonucleótido sobre el molde (F, directa-forward o R, inversa-reversa). Cuando se construyeron dobles o triples mutantes se utilizó el ADN molde que contenía ya una de las mutaciones, y sobre este se introdujo la segunda mutación.

<sup>c</sup> Se indica la secuencia de nucleótidos con orientación 5' a 3'.

### 3.8. Transcripción *in vitro* de ARN de VFA y electroporación de células BHK-21c2

#### 3.8.1. Transcripción *in vitro* de ARN

Para la transcripción de ARN de VFA se empleó el *kit Riboprobe in vitro Transcription System* (Promega), a partir de plásmidos pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 mutados y no mutados, linearizados mediante la incubación con *HpaI*, purificados con fenol/cloroformo

y disueltos en agua estéril libre de nucleasas. Para la síntesis de ARN se preparó una mezcla de reacción (40  $\mu$ l), que contenía 40 mM de Hepes (pH 7,7), 6 mM de acetato de magnesio, 2 mM de espermidina, 10 mM de ditioneitol, 1 U/ $\mu$ l de RNAsina (Promega), 2,5 mM de cada ribonucleósido trifosfato (rATP, rUTP, rGTP, rCTP) (Promega), 1  $\mu$ g/ $\mu$ l de pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 linearizado con *HpaI* y purificado, y 0,5 U/ $\mu$ l de ARN polimerasa de SP6 (Promega). La mezcla se incubó durante 2 h a 37°C (Mateo *et al.*, 2003). La concentración de ARN obtenida se estimó y ajustó mediante electroforesis en geles de agarosa (Gibco o Pronadisa) y tinción con bromuro de etidio (Sigma), tomando como referencia una curva patrón de ARN transcrito y purificado mediante columnas de Sephadex G-25 equilibradas con Tris-HCl 10 mM (pH 8,0) y EDTA 1 mM (*Mini Quick Spin Oligo Columns*, Roche) para eliminar los nucleótidos sin incorporar.

### **3.8.2. Electroporación de células BHK-21c2**

Se transfectaron mediante electroporación células BHK-21c2 con el ARN vírico producto de la transcripción *in vitro*. Para ello, se utilizaron para cada experimento 2-4 x 10<sup>6</sup> células BHK-21c2 procedentes de placas P100 en una confluencia del 70-80%. Las células se resuspendieron en 0,5 ml de tampón de electroporación (numeral 3.1) frío. La suspensión se transfirió a una cubeta de electroporación (BioRad, 0,4 cm), y se añadieron 10  $\mu$ g de ARN de VFA parental o mutante. Como control negativo se utilizó tampón de electroporación sin ARN. Para la transfección se utilizó un electroporador *Gene Pulser* (BioRad), empleando dos pulsos consecutivos de 2 s cada uno, de 280 V, 250  $\mu$ F y 400  $\Omega$ . A continuación la suspensión de células se transfirió a una botella de 25 cm<sup>2</sup> (Nunc) que contenía 4 ml de DMEM con 10 % de SFB, y las células se incubaron a 37°C durante 4 h. Después de la incubación, se retiró el medio y se añadieron 2 ml de DMEM con SFB al 2%. El e.c. fue evaluado bajo microscopio invertido (*DMIL*, Leica) y los virus del sobrenadante de la infección se recogieron secuencialmente a las 45, 55, 72 y/o 95 h.p.t. Posteriormente, las suspensiones celulares fueron clarificadas por centrifugación a 2,500 r.p.m. durante 10 min a 4°C, para eliminar todos los restos celulares, y se dividieron en alícuotas, que se almacenaron a -70°C.

**Tabla 5.** Oligonucleótidos empleados para la amplificación y secuenciación de segmentos genómicos de VFA.

Región genómica <sup>a</sup>	Oligonucleótido <sup>b</sup>	Secuencia <sup>c</sup>	Posición <sup>d</sup>	Orientación <sup>e</sup>
Proteasa L	LR2BIS	GGACGGGAACACGCTGTCT	1471	s
VP4	4D1New	TTGTTCTGGGTGTTGGTTGTGTG	1835	a
VP2	MA4	CAACCTTGTGCATGTGTCC	2140	a
	2R2New	GATGGGCGACATCAGTGACAGGG	2280	s
	JH2	GGGTTGATGAACTGGTGGGG	2345	a
	2R3New	CACGGTCCCAACAGATCAAAG	2470	s
VP3	EDVP3New	AGTTGTCACCATGTTGCCGTAAC	2601	a
	3R1EcoR1New	CACGAACTGACGGGCAAAGGCTACTGG	2744	s
	3D1BIS	GCCGGCCAAGTAGGT	2826	a
	3R3	AGGCTGCCCCACTTGCATACACGCAG	2960	s
	G1	GTTTCAGCCTCGTGGGACGC	3077	a
VP1	1R1L	ACACCGTGTGTTGGCTACGGCG	3572	s
	ED3New	GCTTTAACTGCACCAAAGTTG	3704	s
2B	2B1	CAAACGTGCTGTCCAGAATCTC	4190	a
2C	2CD1	CTCTTCTGAGGCGATCCATGC	4458	a
	2CD1BIS	CTCTTCTGAGGCGATCCAAGC	4458	a

<sup>a</sup> Se indica la región genómica donde hibrida el oligonucleótido (ver [Figura 6a](#)).

<sup>b</sup> Se indica el nombre de cada uno de los oligonucleótidos utilizados.

<sup>c</sup> Se indica la secuencia de nucleótidos con orientación 5' a 3'.

<sup>d</sup> Posición en el genoma de VFA del nucleótido en el extremo 5' del oligonucleótido. La numeración corresponde a la reportada por Escarmís *et al.*, (1999).

<sup>e</sup> Orientación del oligonucleótido iniciador: s (sentido), misma polaridad que el RNA genómico y a (antisentido), polaridad inversa.

### 3.9. Extracción de ARN de VFA

El ARN vírico fue extraído a partir de viriones procedentes de sobrenadantes de infección de monocapas celulares. Para 150 µl de sobrenadante se añadieron 400 µl de Trizol-LS (Invitrogen), y la mezcla se incubó durante 5 min a t.a. Se añadieron 200 µl de cloroformo (Merck), la mezcla se agitó abundantemente y se incubó durante 10 min a t.a. Posteriormente, se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 15 min a 4°C. Se recogió la fase acuosa y se añadieron 250 µl de isopropanol (Merck). Luego, el ARN se precipitó por 1 h a -20°C, y se centrifugó a 12,000 r.p.m. durante 10 min. Se lavó con 500 µl de 75% de etanol (Merck) y se centrifugó a 10,000 r.p.m. durante 10 min. Finalmente, se resuspendió el ARN en 30 µl de agua con dietilpirocarbonato (DEPC) (Sigma) y se almacenó a -70°C.

### **3.10. Obtención de ADN a partir de ARN vírico mediante RT-PCR**

Para obtener los segmentos de ADN de doble cadena deseados a partir del ARN extraído de viriones, se realizó un proceso acoplado consistente en la transcripción inversa catalizada por la retrotranscriptasa del virus de la mieloblastosis aviar (AMV-RT, Promega), y la amplificación del segmento de ADN mediante PCR, utilizando la ADN polimerasa termoestable EHF (*Expand High Fidelity*, Roche) y los oligonucleótidos apropiados. Se siguieron las instrucciones facilitadas por el fabricante, realizando el proceso de amplificación por RT-PCR en un sólo paso en el tampón y concentración óptimas para la enzima EHF. La mezcla de la reacción (50 µl), contenía 3-4 µl de solución de ARN vírico, 100 ng de cada oligonucleótido iniciador (ver **Tabla 5**; numeral 3.6), de acuerdo a la región a amplificar, 5 µl de tampón de reacción 10X para EHF (Tampón 3, Roche), 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM de cada desoxinucleósido trifosfato (dATP, dTTP, dGTT, dCTT; Invitrogen), 0,3 µl de RNAsina (1 U/µl, Promega), 0,5 µl de AMV-RT (10 U/µl, Promega), 0,5 µl de EHF (10 U/µl, Roche). La incubación se realizó durante una hora a 42°C, seguida de 2 min a 95°C, y de 30 ciclos compuestos por incubaciones sucesivas de 30 s a 95°C, 1 min a 60°C y 3 min con 30 s a 68°C, y finalmente una extensión de 10 min a 72°C. Los productos de RT-PCR fueron purificados mediante el *kit Montage PCR* (Millipore), siguiendo las instrucciones de fabricante. El ADN purificado se cuantificó mediante electroforesis en geles de agarosa y tinción con bromuro de etidio.

### **3.11. Secuenciación**

La secuenciación de ADN se realizó en la compañía MacroGen, Inc. (Seúl, Corea del Sur), o en el Servicio Interdepartamental de Investigación (SIDI) de la Universidad Autónoma de Madrid/Unidad Genómica del Parque Científico de Madrid. Para cada reacción de PCR se enviaron 50 ng de los productos de RT-PCR previamente purificados como se describió en el numeral 3.10, y 100 ng de los plásmidos pO<sub>1</sub>K/C-S8c1 o p3242/C-S8c1. Se emplearon 3 pmol de cada uno de los oligonucleótidos para la secuenciación de segmentos genómicos de VFA (**Tabla 5**; numeral 3.6). El análisis de las secuencias se realizó con el programa *4peaks* (<http://mekentosj.com/4peaks/>).

### **3.12. Obtención, purificación e inactivación de viriones de VFA**

#### **3.12.1. Obtención y purificación de viriones marcados radiactivamente con $^{35}\text{S}$**

Se infectaron aproximadamente  $1,2 \times 10^8$  células BHK-21c2 sembradas en B175 (Nunc) a una m.d.i. de 3. Después de 2 horas post-infección (h.p.i.) se retiró el medio y se añadió medio DMEM deficiente en metionina y cisteína, suplementado con 5% de SFB. Se realizó una incubación por 1 h y se añadió una mezcla radiactiva L- $(^{35}\text{S})$  Metionina/Cisteína (*Easytag Express protein labeling mix*, PerkinElmer). Se recogió de modo conjunto el sobrenadante y las células remanentes cuando se observó efecto citopático completo, y la suspensión se almacenó a  $-70^\circ\text{C}$ . Subsiguientemente, esta suspensión se descongeló y se centrifugó a 2,500 r.p.m. por 10 min a  $4^\circ\text{C}$ . Luego se tomó el sobrenadante libre de células y se centrifugó a 9,000 r.p.m. en un rotor SS34-V1 (Sorvall) durante 20 min a  $4^\circ\text{C}$ . Posteriormente, se adicionó 5 mM de EDTA, pH 8,0, y se ultracentrifugó a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón TNE en un rotor AH-627 (Sorvall) a 25,000 r.p.m. durante 2.5 h a  $4^\circ\text{C}$ . El sedimento se resuspendió en TNE, y la suspensión se sometió a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa del 7,5% y 30% en TNE en un rotor SW40 (Beckman) a 37,000 r.p.m por 1 h a  $4^\circ\text{C}$ . El gradiente se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml, y se determinaron las fracciones que contenían viriones mediante detección de radiactividad en un contador de centelleo líquido (*1219 Rackbeta*, Wallac). Las fracciones que contenían los viriones (coeficiente de sedimentación de 140S), se mezclaron y se dializaron extensivamente frente a PBS.

#### **3.12.2. Obtención y purificación de viriones de VFA no marcados**

Los viriones fueron purificados como se describió en el numeral 3.12.1, excepto que se utilizó medio DMEM normal y se omitió el marcaje radiactivo con metionina-cisteína. Las fracciones que contenían viriones se determinaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida al 11% conteniendo dodecilsulfato sódico (SDS, Sigma) y 8 M de Urea (SDS-Urea-PAGE).

### **3.12.3 Inactivación de viriones de VFA con etilenimina binaria**

Viriones de VFA (purificados como describió en el numeral 3.12.2) se inactivaron añadiendo etilenimina binaria (BEI) como se describió previamente (Aarthi *et al.*, 2004; Patil *et al.*, 2002). Para ello, se disolvió 0,01 M de hidrobromuro de 2-bromoetilamina (BEA, Merck) en una solución de 0,2 N de hidróxido sódico. Posteriormente, se agregó 0,5 ml/L de violeta  $\beta$ -naftol, para visualizar de forma indirecta la formación de BEI, dado por un cambio de color de violeta a naranja (~15 min), provocando una disminución en el pH de ~12,5 a ~8,5. La suspensión se incubó a 37°C durante ~1 h, con agitación periódica. La inactivación se prolongó durante 24 h adicionales. Después de la inactivación, el BEI residual en el producto se neutralizó por adición de 2% de tiosulfato de sodio. Al final de la inactivación el virus fue dializado frente a PBS durante toda la noche. Para verificar la inactivación completa de virus, se realizó un ensayo de plaqueo en medio de agar semisólido en células BHK-21c2, en el cual no se observaron unidades formadoras de placas en ninguna de las diluciones probadas ( $10^0$ - $10^{-8}$ ).

### **3.12.4. Inactivación de viriones de VFA mediante la inducción de actividad endonucleasa**

Viriones de VFA (purificados como se describe en el numeral 3.12.2) se inactivaron mediante activación de endonucleasa endógena como se ha descrito previamente (Amadori *et al.*, 1987; Patil *et al.*, 2002; Scodeller *et al.*, 1984). Brevemente, 2,4 ml de una suspensión de virus en PBS incompleto, se mezcló con 1,2 ml de una solución de inactivación (0,3 M de Tris-HCl pH= 8,5, 1,5 M de  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ). La solución se filtró a través de una membrana de acetato de celulosa de 0,45  $\mu\text{m}$  (Palm Life Sciences) y se incubó durante 4 h a 37°C. Al final de la inactivación el virus fue dializado frente a PBS. Para verificar la inactivación completa de virus, se realizó un ensayo de plaqueo en medio de agar semisólido en células BHK-21c2, en el cual no se observaron unidades formadoras de placas en ninguna de las diluciones probadas ( $10^0$ - $10^{-8}$ ).



### **3.13. Expresión y purificación de cápsidas vacías de VFA**

Para la obtención de cápsidas vacías de VFA en pequeñas cantidades se utilizó un sistema de expresión basado en virus vaccinia recombinante. La puesta a punto del método implicó el ensayo de diferentes modificaciones en el procedimiento. A continuación se describen los métodos finalmente implementados para la producción analítica o preparativa.

#### **3.13.1. Expresión analítica de cápsidas vacías de VFA**

Células BHK-21c2 sembradas en placas de 6 pocillos (M6, Nunc) a una confluencia entre 80-90% fueron infectadas con 8  $\mu$ l de vT7f3 previamente titulado ( $2 \times 10^6$  unidades de luz, numeral 3.3.5), diluido en DMEM completo sin suero para dar un volumen total de 200  $\mu$ l por pocillo. Las células se incubaron a 37°C durante 1 h.

Treinta minutos antes de finalizar el tiempo de adsorción del virus se preparó la mezcla de transfección como sigue: se diluyeron 3  $\mu$ l de FuGENE 6 (Roche) en DMEM (sin suero, antimicóticos y antibióticos) para un volumen final de 100  $\mu$ l. La mezcla se incubó durante 10 min a t.a., y luego se agregaron 2  $\mu$ g del plásmido PL1-1 (parental o mutante) en ausencia o presencia del plásmido pSKRH-3C (0,2 – 0,5  $\mu$ g por pocillo) y la mezcla resultante se incubó durante 15 min a t.a.

Tras finalizar el tiempo de adsorción del virus, los pocillos se lavaron dos veces, utilizando cada vez 1 ml de DMEM sin suero. Luego se agregó 1 ml de DMEM sin suero. A continuación se agregaron 100  $\mu$ l de la mezcla de transfección, y las células se incubaron durante 4 h a 37°C. Luego se agregó 1,5 ml de DMEM con 10% de SFB. Adicionalmente, las células que fueron transformadas con PL1-1, fueron co-transfectadas después de 8 h.p.t. con el plásmido pSKRH-3C (0,2  $\mu$ g – 0,5  $\mu$ g por pocillo), y se continuó la incubación hasta cumplir 16 a 24 h.p.t. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se lavó la placa con 0,5 ml de PBS y se agregaron 100  $\mu$ l de tampón de lisis (numeral 3.1) frío por pocillo. Se incubó durante 3 min y se resuspendió el lisado. Luego se centrifugó a 12,000



r.p.m. por 5 min a 4°C. Los lisados celulares fueron analizados por SDS-PAGE y Western Blot como se describe en el numeral 3.13.4.

### **3.13.2. Expresión de cápsidas vacías de VFA en el sistema de expresión de virus vaccinia recombinante a gran escala**

Células BHK-21c2 sembradas en P100 (10-15 P100 por preparación) con una confluencia de 80-90%, fueron infectadas con 72 µl de vT7f3 por P100 en 528 µl de DMEM completo sin suero, para un volumen final de 600 µl de inóculo viral ( $2 \times 10^6$  unidades de luz, numeral 3.3.5) en DMEM completo sin suero (en un volumen total de inóculo de 720 µl para 10 P100 o 1080 µl para 15 P100), y las células se incubaron a 37°C durante 1 h.

La mezcla de transfección se preparó como se indica en el numeral 3.13.1, usando las siguientes cantidades por P100: 27 µl de FuGENE 6 (Roche o Promega) para un volumen final de mezcla de 600 µl; 18 µg del plásmido PL1-1 (parental o variante) en ausencia o presencia 4,5 µg del plásmido pSKRH-3C.

Tras finalizar el tiempo de adsorción del virus, los pocillos se lavaron dos veces, utilizando cada vez 3 ml de DMEM sin suero, y se agregaron 600 µl de la mezcla de transfección. Las células se incubaron durante 4 h a 37°C. Luego se agregaron 3 ml de DMEM con 10% de SFB y se continuó la incubación hasta cumplir 16 a 24 h.p.t. Posteriormente, se retiró el sobrenadante, se lavó la placa con 0,5 ml de PBS y se agregaron 500 µl de tampón de lisis frío por pocillo. Se incubó durante 3 min y se resuspendió el lisado. Luego se centrifugó a 12,000 r.p.m. por 5 min a 4°C. Los lisados celulares fueron analizados como para las preparaciones a pequeña escala.

### **3.13.3. Purificación de cápsidas vacías de VFA**

Se obtuvieron cápsidas vacías de VFA mediante el sistema de expresión de vaccinia recombinante como se describió en el numeral 3.13.2. Se ensayaron una serie de procedimientos de purificación modificando diversas etapas y condiciones. A continuación

se describe el protocolo que permitió un mejor compromiso en cuanto a cantidad y pureza de las cápsidas vacías obtenidas.

Los lisados celulares conteniendo cápsidas vacías se centrifugaron a 14,000 r.p.m., por 10 min a 4°C. Se tomó el sobrenadante, que se ultracentrifugó a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón TNE en un rotor SW40 (Beckman) a 35,000 r.p.m. durante 5 h a 4°C. Al sedimento se le añadieron 400 µl de TNE, y se dejó durante toda la noche a 4°C. Al día siguiente, el sedimento se resuspendió completamente pero cuidadosamente con jeringa y aguja de 22G, y la suspensión se sometió a ultracentrifugación en gradiente de sacarosa del 7,5% al 30% en TNE en un rotor SW40 a 37,000 r.p.m. durante 3 h a 4°C. El gradiente se fraccionó en alícuotas de 0,6 ml, y se determinaron las fracciones que contenían las cápsidas vacías mediante Western Blot utilizando el anticuerpo monoclonal MAb SD6 (Mateu *et al.*, 1987). Las fracciones que contenían las cápsidas vacías (coeficiente de sedimentación de 75S), se mezclaron y se dializaron extensivamente frente a PBS. A continuación, se concentraron a un volumen final de 1-1,5 ml usando un dispositivo *Amicón Ultra-4* con un peso molecular de corte de 100,000 kDa (Millipore), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, y se sometieron a ultracentrifugación en gradiente de cloruro de cesio (obtenido de una solución de índice de refracción 1,380 g/ml), en un volumen total de 10 ml. Se centrifugó en un rotor TFT. 75.13 o TST.80.13 (Beckman) a 50,000 r.p.m. durante 24 h a 8°C. El gradiente se fraccionó en alícuotas de 0,8 ml y se determinaron las fracciones que contenían las cápsidas vacías mediante Western Blot empleando el MAb SD6. Posteriormente, las fracciones que contenían las cápsidas vacías fueron dializadas frente a PBS y concentradas usando un dispositivo *Amicón Ultra-4* de 100,000 kDa.

Finalmente, para obtener una preparación de cápsidas vacías con la mayor pureza posible, se intentó eliminar los pentámeros de VFA que normalmente contaminan las preparaciones de cápsida mediante cromatografía de afinidad utilizando una columna de *Affigel 10* (BioRad) en la que se había acoplado el fragmento de anticuerpo específico para pentámeros VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub>. El acoplamiento del anticuerpo a la matriz se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se lavó 1 ml de gel con tres volúmenes de agua desionizada estéril fría, y se resuspendió en 1 ml de solución del anticuerpo a una concentración de 10 mg/ml en tampón MOPS 20 mM, pH 7,0 (Sigma), incubándose durante 3,5 h a 4°C con agitación suave. Luego se montó el gel en una

columna *HR5/10* (Pharmacia Biotech) y se lavó con MOPS 20 mM, pH 7,0 a un flujo de 0,08 ml/min, hasta que la absorbancia a 280 nm ( $A_{280}$ ) bajó a cero. Finalmente, la columna se lavó con tres volúmenes de PBS y se guardó en PBS con 0,2% de azida sódica.

Para la eliminación de pentámeros de preparaciones de cápsidas vacías, la suspensión de cápsidas parcialmente purificadas y concentradas (100  $\mu$ l) se pasó a través de la columna de *Affigel 10* con el anticuerpo acoplado, a un flujo de 0,8 ml/min. Las fracciones no retenidas que contenían las cápsidas vacías fueron concentradas mediante ultrafiltración como antes, y analizadas mediante microscopia electrónica (numeral 3.13.5). La proteína retenida se eluyó con 0,1 M de citrato de sodio (pH 2,5) a un flujo de 0,8 ml/min. Posteriormente, la columna se lavó con tres volúmenes de PBS.

Como un método alternativo para eliminar los pentámeros de las preparaciones de cápsidas vacías, se ensayó la posibilidad de utilizar el fragmento de anticuerpo VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> acoplado a bolas magnéticas (*Dynabeads M-280 Tosyl-activated*, Invitrogen), en vez de a una matriz de *Affigel*. El anticuerpo fue acoplado siguiendo las instrucciones del fabricante. Brevemente, se incubaron las bolas magnéticas con la cantidad adecuada del anticuerpo (40  $\mu$ g) en 1 ml de tampón borato sódico 0,1 M, pH 9,0, a 37°C durante 16 h, con rotación suave constante. Luego se lavaron con PBS y se bloquearon los sitios no ocupados con el anticuerpo con un tampón Tris-HCl 0,2 M, pH 8,5 conteniendo 0,1% de BSA, durante 4 h a t.a. Por último, se lavaron con PBS y se guardaron a 4°C.

Para la eliminación de pentámeros de preparaciones de cápsidas vacías, las bolas magnéticas se lavaron dos veces con PBS, este se retiró y se incubaron con 1 ml de la preparación de cápsidas concentradas, durante toda la noche a 4°C, con rotación suave y constante. Se tomó el sobrenadante que contenía las cápsida vacías, y se hicieron tres lavados sucesivos con PBS durante 5 min. La elución de la proteína retenida se hizo utilizando un tampón glicina 0,2 M, pH 2,2. Se tomó el sobrenadante y se neutralizó rápidamente con tampón Tris-HCl 1 M, pH 9,1. Los sobrenadantes recogidos se analizaron mediante microscopia electrónica (numeral 3.13.5).

### **3.13.4. Análisis de la pureza de preparaciones de cápsidas vacías mediante SDS-PAGE y Western Blot**

La identificación de fracciones procedentes de gradientes de sacarosa o ClCs que contenían cápsidas vacías, y el análisis de la pureza de las preparaciones de cápsidas vacías, se realizaron mediante SDS-PAGE y Western Blot. Una alícuota de 10 µl se mezcló en proporción 1:1 con tampón de ruptura 2x (0,1 M Tris-HCl pH 6,8, 8,3% de glicerol (Merck), 3,3% de SDS, 4% de β-mercaptoetanol (Merck), 0,16 mg/ml de azul de bromofenol (Sigma)), se incubó a 100°C durante 2 min y se aplicó a geles al 12% de acrilamida (BioRad). Tras la electroforesis, la proteína en el gel se transfirió a una membrana de NC (BioRad) utilizando un sistema semihúmedo (BioRad) durante 1 h a 400 mA con agitación y a 4°C. La NC se incubó con leche en polvo (Nestlé) al 5% en PBS con 0,1 % Tween-20 (Sigma) durante 1 h a t.a. o durante toda la noche, con agitación. Luego se incubó durante 1 h a t.a. con una mezcla de MAbs específicos para las proteínas VP1, VP2 y VP3, (SD6, 4A3 (suministrado por la Dra. Emiliana Brocchi, Istituto Zooprofilattico della Lombardia e dell Emilia, Brescia, Italia) y 6F6, respectivamente; Mateu *et al.*, 1987), diluidos 1/2000 en PBS con 0,1% de Tween y 5% de leche en polvo. A continuación se lavó la NC por 3 veces durante 10 min con PBS con 0,1% de Tween-20. Seguidamente, se añadió el anticuerpo secundario anti-ratón acoplado a peroxidasa (BioRad) diluido 1/2000 en PBS con 0,1% de Tween-20 y 5% de leche en polvo. La NC se incubó a t.a. durante 30 min, se lavó de nuevo 3 veces durante 10 min con PBS con 0,1% de Tween-20, se realizó un último lavado con PBS (sin Tween-20) y se reveló con el *kit ECL* (GE Healthcare). Para ello, se mezclaron los reactivos de revelado en relación 1:1 y se añadieron a la membrana de NC, incubando 3 min. A continuación se retiró el exceso de líquido sobre un papel secante, se cubrió la NC con plástico transparente y se realizaron autorradiografías con distintos tiempos de exposición (de segundos a minutos).

Finalmente, cuando fue necesario cuantificar la intensidad de las bandas tanto en geles de SDS-PAGE como en autorradiografías, se llevó a cabo un densitometrado de las mismas con un densitómetro *GS-800 o GS-710* (BioRad) y el programa de análisis *Quantity One 1-D Analysis* (BioRad).

### **3.13.5. Análisis y visualización de cápsidas vacías de VFA mediante microscopía electrónica**

Cápsidas vacías purificadas como se detalla en el numeral 3.13.3 fueron adheridas durante 4 min sobre rejillas de cobre de 300 huecos por pulgada, recubiertas de colodión y carbono e ionizadas (Gilder). Las rejillas se lavaron con agua tridestilada tres veces sucesivas, y posteriormente se tiñeron con 2% de fosfotungstato de sodio a pH 7,14 o 2% de acetato de uranilo (Panreac) durante 1 min. Las muestras fijadas se observaron en un microscopio electrónico de transmisión (*JEM-1010*, JEOL) en el servicio de microscopía electrónica del CBMSO, con la ayuda de la Dra. María Teresa Rejas y la técnico Milagros Guerra. Se tomaron fotografías desde 40,000 hasta 100,000 aumentos (en general) utilizando la cámara *TemCam-F416* (TVips) acopladas al microscopio y el programa de digitalización *ME-MENU4* (TVips).

Para estimar la concentración y cantidad de cápsidas vacías obtenidas se utilizaron bolas de látex *SI30-1* (BAL-TEC), de 112 nm de diámetro y una concentración de  $1,29 \times 10^{12}$  bolas/ml. Las bolas de látex se desagregaron mediante sonicación en un baño (*P. Selecta Ultrasons*) durante 30 min. Las partículas víricas a cuantificar se mezclaron en distintas relaciones con las bolas de látex en un volumen final de 10  $\mu$ l. La mezcla se sometió a tinción negativa y se visualizó al microscopio electrónico como se ha descrito en el párrafo anterior, tomando imágenes a 50,000 aumentos. La relación entre la cantidad de partículas virales y bolas se promedió contando un número suficiente de campos, y esta relación se multiplicó por la concentración de bolas para estimar la concentración de las partículas virales en la muestra.

### **3.14. Ensayo de la cinética de producción de VFA**

Este ensayo se realizó esencialmente como se describió previamente (Mateo y Mateu, 2007). Para cada una de las variantes de VFA y el virus parental como control, se infectaron dos P60 ( $3 \times 10^6$  células) confluentes a una m.d.i. de 10. La progresión del e.c. fue comparada a diferentes tiempos mediante la observación bajo microscopio invertido (*DMIL*, Leica). La cinética de producción de virus extracelular se determinó mediante

titulación por plaqueo (numeral 3.3.3) de las alícuotas de virus recogidas en diferentes instantes de tiempo post-infección (0, 3, 6, 9, 12, y 24 h). Tanto el ensayo de producción viral como el plaqueo se realizaron por duplicado.

### **3.15. Ensayo de la formación de intermediarios de ensamblaje de VFA mediante inmunofluorescencia *in situ***

Se utilizaron células BHK-21c2 (confluencia de un 80%), las cuales fueron electroporadas como se describe en el numeral 3.8.2. Se sembraron aproximadamente  $2,5 \times 10^5$  células electroporadas en 1 ml de DMEM completo directamente sobre cubreobjetos redondos de 12 mm de diámetro (Menzel-Gläser) colocados en una placa M24 (Falcon). Las células se incubaron durante 4 h a 37°C. Posteriormente, el medio fue retirado y reemplazado por DMEM con 2% de SFB, y las células se incubaron durante 30 h a 37°C. Transcurrido este tiempo, las células se lavaron con PBS precalentado a 37°C, y el lavado se repitió dos veces más. A continuación, las células se fijaron con 4% de formaldehído (Merck) durante 30 min. Se retiró el formaldehído y se realizaron tres lavados sucesivos con PBS (5 minutos cada lavado). Después, las células se incubaron durante 10 min en un tampón 10 mM Glicina-NaOH pH 8,5, y se permeabilizaron con 0,2% de Tritón X-100 (Sigma) en PBS durante 10 min a 4°C. Se realizaron tres lavados sucesivos con PBS, seguidos de incubación durante 15 min a t.a. en 3% de albúmina sérica bovina (BSA, Sigma) en PBS. A continuación, las preparaciones se incubaron durante 1 hora a t.a. en una solución de MAb 5C4 (suministrado por la Dra. E. Brocchi); se utilizó fluido ascítico a una concentración 1/500, en 3% de BSA en PBS. Este anticuerpo reconoce un epítipo discontinuo presente tanto el protómero biológico no procesado como en la superficie de la cápsida ensamblada, pero no reconoce proteínas aisladas (Mateu *et al.*, 1994; Lea *et al.*, 1994; Sáiz *et al.*, 1994). Se lavaron las células tres veces sucesivas con PBS (10 min cada lavado), y se incubaron durante 1 h a t.a. en oscuridad con un anticuerpo anti-IgG de ratón (Alexa 488, Invitrogen); se utilizó una dilución de 1/500 en PBS con 3% de BSA, y se realizaron tres lavados sucesivos con PBS. Para el posterior conteo celular, se realizó una incubación durante 3 min con 4'-6-diamidino-2-fenylindole (DAPI, Calbiochem) a una concentración final de 1 µg/ml preparado en PBS. Tras varios lavados finales con PBS, los cubreobjetos se montaron sobre portaobjetos (Menzel-Gläser), utilizando Mowiol-

DABCO. Las preparaciones se dejaron secar durante 24 h a t.a, y se visualizaron en microscopio vertical de fluorescencia *Axioskop plus* (Zeiss) acoplado a una cámara CCD *Coolsnap FX color* (Roper Scientific). Las imágenes se procesaron utilizando el programa *Metavue 5.07* (Universal Imaging Corporation). Finalmente, se contaron suficientes campos hasta completar 600 células (tinción positiva para DAPI), o bien el número de células totales en el cubreobjeto si éste era inferior a 600, y se determinó el porcentaje de estas células totales que resultaron con fluorescencia positiva para 5C4.

### **3.16. Análisis de la especificidad antigénica de VFA mutantes**

Se obtuvieron viriones parcialmente purificados mediante ultracentrifugación a través de un colchón de sacarosa al 20% en tampón TNE. La cantidad de proteína total fue estimada por SDS-Urea-PAGE. Cantidades iguales de viriones purificados (1-2 µg) fueron transferidas a membranas de nitrocelulosa (NC, BioRad), prelavadas por 1 h con PBS, usando un aparato de dot-blot (BioRad). Después de la adsorción a presión atmosférica, los pocillos fueron lavados extensivamente con PBS por filtración en vacío. Posteriormente, la NC se saturó con 3% de BSA en PBS y se incubó por 90 min a t.a. con diluciones seriadas de sobrenadantes de cultivo de hibridomas o fluido ascítico conteniendo MAb anti-VFA (Mateu *et al.*, 1987) en PBS-1% BSA (los anticuerpos utilizados se indican en el siguiente párrafo). Se lavó dos veces con 0,05% de Tween 20 en PBS (como en todos los pasos de lavado subsecuentes). Luego, la NC se incubó por 1 h en una dilución 1/2000 en PBS-1% BSA de un IgG anti-ratón preparado en cabra, y conjugado a peroxidasa (BioRad). Se lavó brevemente con PBS, y luego 2 x veces con 0,005% de Tween 20 en PBS durante 40 min cada vez. Finalmente, se añadió una solución de 0,015% de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; 0,5 mg/ml de 4-cloro-1-naftol (Sigma) y 20% de metanol en PBS. Una vez se desarrolló el color, la reacción se detuvo con agua destilada.

El panel de MAbs utilizado es representativo para los diferentes sitios antigénicos de VFA C-S8c1 y se ha describió previamente (Mateu *et al.*, 1987, 1990, 1994; Lea *et al.*, 1994). Para el sitio A, se utilizaron los MAbs SD6, 4G3, 4C4, 5A2, 7JD1, para el sitio C el MAb 7JA1 y para los subsitios D1, D2 y D3 los MAbs 1G5, 2E5 y 5C4, respectivamente.

### **3.17. Determinación de la estabilidad de viriones y cápsidas vacías de VFA**

#### **3.17.1. Determinación de la estabilidad térmica del virión frente a la inactivación de su infectividad**

La resistencia de viriones de VFA a la inactivación térmica de su infectividad se determinó mediante experimentos cinéticos. Para ello, se tomó una alícuota de 1 ml de virus amplificado a partir de sobrenadante de cultivo obtenido de infección o transfección de células BHK-21c2, con un título viral aproximado entre  $2 \times 10^7$ -  $4 \times 10^7$  unidades formadoras de placa (PFU) por ml. Se realizó la incubación a una temperatura constante de 42°C durante diferentes intervalos de tiempo (30, 60, 120, 180 y 240 min). Tras la incubación, las muestras se transfirieron a hielo, y el título de virus se determinó mediante plaqueo utilizando diferentes diluciones (numeral 3.3.3). Los títulos obtenidos tras los diferentes tiempos de calentamiento se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden usando el programa *Kaleidagraph* (Abelbeck Software), como se ha descrito previamente (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004), para obtener la constante cinética de inactivación de la infectividad del virión.

#### **3.17.2. Determinación mediante ultracentrifugación de la estabilidad del virión frente a su disociación en subunidades**

La resistencia de viriones de VFA frente a la disociación en subunidades pentaméricas por acción del calor o a diferentes pHs se determinó normalmente mediante la cuantificación directa de la cantidad de viriones remanentes en experimentos cinéticos. Para ello, alícuotas de viriones purificados y marcados radiactivamente con  $^{35}\text{S}$  se incubaron en las condiciones deseadas. i) Ensayos del efecto de mutaciones sobre la estabilidad térmica: se realizaron incubaciones a 42°C durante diferentes intervalos de tiempos (4, 8, 18, 30, 40 y 60 h). ii) Ensayos de estabilidad térmica a diferente fuerza iónica: se realizaron incubaciones a 42°C en presencia o ausencia de 1 M de NaCl, durante los intervalos de tiempo indicados antes. iii) Ensayos de estabilidad a diferentes pHs: se



mezclaron alícuotas de 100  $\mu$ l de viriones con 300  $\mu$ l de tampón fosfato salino (50 mM  $\text{NaPO}_4$  y 140 mM NaCl) a diferentes pHs (5,6 – 7,2), y la mezcla se incubó durante 30 min a t.a. Posteriormente, las muestras fueron neutralizadas mediante la adición de 1 M de Tris-HCl pH= 7,6.

Inmediatamente después de cualquiera de las incubaciones indicadas, las muestras se transfirieron a hielo, y posteriormente se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa del 7,5% al 45% en tampón TNE en un rotor SW40 (Beckman) a 18.000 r.p.m. durante 18 h a 4°C. El gradiente se fraccionó en alícuotas de 0,5 ml. La cantidad relativa de viriones completos (140S) en cada alícuota se determinó en un contador de centelleo líquido (*1219 Rackbeta*, Wallac). En general, cuando se analizaron virus mutados, se utilizó en el mismo experimento, como control positivo, un virus parental que había sido purificado y procesado en paralelo con el mutante investigado, para excluir que alguna diferencia en el procedimiento pudiera afectar a los valores relativos de estabilidad. En el caso de las cinéticas, los datos (proporción de viriones remanentes en función del tiempo de incubación) se ajustaron a un modelo de decaimiento exponencial de primer orden usando el programa *Kaleidagraph* (Abelbeck Software), para obtener la constante cinética de disociación del virión en subunidades. En el caso de los estudios a diferentes pHs, los datos (proporción de viriones remanentes a cada pH tras un tiempo fijo de incubación) se normalizaron con respecto al valor obtenido a pH 7,2.

### **3.17.3. Determinación mediante ELISA de la estabilidad térmica del virión frente a su disociación en subunidades**

Para establecer un método simple (que no implicará el marcaje radiactivo de virus) para la determinación de la estabilidad térmica de viriones frente a su disociación en pentámeros, se puso a punto un ensayo de ELISA. El ensayo se basa en la utilización de un reactivo derivado de un anticuerpo que reconoce específicamente pentámeros de VFA, pero no reconoce ni proteínas individuales, ni protómeros, ni cápsidas o viriones completos (Harmsen *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011). Este reactivo, denominado VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub>, deriva de un fragmento de anticuerpo de dominio único obtenido de llama (VHH M3), y se obtuvo mediante fusión génica de VHH M3 con un segundo dominio VHH que

reconoce una inmunoglobulina porcina. Fue suministrado por el Dr. Michiel Harmsen del Central Veterinary Institute, Universidad de Wageningen, Holanda.

**Biotinilación de VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub>.** El VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> fue biotinilado usando el reactivo sulfo-N-hydroxysuccinimide-LC-biotin (Thermo Scientific) de acuerdo a las instrucciones del fabricante. Para ello, se usó un exceso molar de 20 veces del reactivo de biotina para el marcaje del anticuerpo. La mezcla se incubó durante 30 min a t.a. Posteriormente, el anticuerpo biotinilado fue dializado frente a PBS a 4°C para eliminar el exceso de biotina no unida al anticuerpo.

**Ensayo de ELISA en sándwich.** Se describen las condiciones óptimas obtenidas después de poner a punto el método, utilizando diferentes concentraciones y tiempos de incubación de los diferentes reactivos, y comparando los resultados con los obtenidos en paralelo por el método de referencia (basado en el uso de viriones marcados radiactivamente, numeral 3.17.2). Se utilizaron placas de 96 pocillos de PVC de fondo plano, activadas (Titertek). En primer lugar, se añadió una dilución 1/100 de fluido ascítico conteniendo el MAb SD6 en 50 mM de tampón carbonato/bicarbonato, pH 9,6 (100 µl por pocillo), y se incubó durante 2 h a 37°C, seguido de tres lavados con PBS con 0,1% de Tween-20. La superficie de los pocillos se bloqueó mediante incubación con 5% de leche en polvo en PBS con 0,1% de Tween-20 (100 µl por pocillo) a 4°C durante toda la noche. A continuación, se añadió una suspensión que contenía 2-3 µg de viriones de VFA (purificados como se describió en el numeral 3.12.2, e incubados en diferentes condiciones), en PBS con 5% de leche y 0,1% de Tween-20 (100 µl por pocillo), y se incubó durante 1 h a 37°C, seguido de tres lavados con PBS con Tween-20. Seguidamente, se añadió una solución que contenía 12,5 µg de la versión biotinilada del VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> en PBS con 5% de leche y 0,1% de Tween-20 (50 µl por pocillo), y se incubó durante 1 h a t.a. Tras realizar tres lavados con PBS en 0,1% de Tween-20, se añadió una solución de 1 µg/ml de estreptavidina conjugada a peroxidasa (Jackson Immuno Research) en PBS con 5% de leche y 0,1% de Tween-20 (50 µl por pocillo), incubando durante 30 min a t.a. Después de realizar otros tres lavados con PBS con 0,1% de Tween-20, se adicionó 100 µl por pocillo de una solución de 0,5 mg/ml del substrato/cromógeno 2,2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid (ABTS, Sigma) (100 µl por pocillo). La solución de ABTS se preparó en tampón citrato 200 mM

(100 mM de ácido cítrico monohidratado y 100 mM de citrato trisódico dihidratado, pH 4,0); inmediatamente antes de su uso, a esta solución de ABTS se añadieron 10  $\mu$ l de 30% de peróxido de hidrógeno por 10 ml de solución. Finalmente, se registró la absorbancia a 405 nm ( $A_{405}$ ) en un lector de placas (*Multiskan MS*, Labsystem). En cada placa se usaron cuatro réplicas del control negativo y por cada condición ensayada. En cada caso se determinó el valor promedio y desviación estándar de la absorbancia. Los valores de absorbancia son proporcionales a la cantidad de pentámero en la muestra y, por tanto, a la cantidad de partículas disociadas. El porcentaje de partículas disociadas en cada caso se determinó dividiendo el valor de absorbancia obtenido entre el valor de absorbancia correspondiente a 100% de disociación (obtenido mediante incubación de una alícuota de viriones a 42°C durante 60 h).

#### **3.17.4. Determinación de la estabilidad térmica de la cápsida vacía frente a su disociación en subunidades**

Para determinar la estabilidad térmica a 42°C de cápsidas vacías de VFA, se utilizaron preparaciones purificadas como se indica en el numeral 3.13.3. Alícuotas de 1 ml de la preparación se incubaron a 42°C a diferentes intervalos de tiempos (8, 18, 30 h). Cada alícuota se transfirió inmediatamente a hielo, y luego se sometieron a ultracentrifugación en gradientes de sacarosa del 7,5% al 45% en tampón TNE en un rotor SW40 (Beckman) a 18,000 r.p.m. durante 18 h a 4°C. El gradiente se fraccionó en alícuotas de 0,65 ml y se determinaron las fracciones que contenían las cápsidas vacías íntegras o disociadas por calentamiento a subunidades pentaméricas mediante Western Blot, utilizando el MAb SD6 como se indica en el numeral 3.13.4. Para cuantificar la intensidad de las bandas en las autorradiografías, se utilizó un densitómetro *GS-800* (BioRad) y el programa de análisis *Quantity One 1-D Analysis* (BioRad), expresando la intensidad de las bandas como unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm<sup>2</sup>). Los valores para cada una de las condiciones se expresaron como la proporción de cápsidas vacías no disociadas después de calentamiento a 42°C, tomando como un valor de 100% a la suma de los valores obtenidos de la intensidad de las bandas obtenidos de las cápsidas disociadas y no disociadas para cada uno de los tiempos.

### **3.18. Ensayo de toxicidad celular**

Se utilizó el método colorimétrico *CellTiter 96 AQueous One Solution Cell Proliferation Assay* (Promega), de acuerdo a las instrucciones del fabricante, para evaluar la posible citotoxicidad de un agente aglomerante (Ficoll 70) para las células BHK-21c2. Brevemente, BHK-21c2 cercanas a la confluencia sembradas en placas de cultivo de 96 pocillos (Falcon), fueron lavadas con PBS incompleto (sin  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) e incubadas con concentraciones crecientes (0-200 g/L) de Ficoll PM70 (GE Healthcare) durante 90 min a t.a. Después de lavar con DMEM, las células se incubaron durante 90 min a 37°C con [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium] (MTS), y se registró la absorbancia a 490 nm ( $A_{490}$ ) mediante el uso de un lector de placas (*Multiskan MS*, Labsystem). Este ensayo está basado en la conversión de una sal de tetrazolio por enzimas celulares en un producto que es soluble en el medio de cultivo conocido como formazán. Esta conversión es producida por la NADH (forma reducida del dinucleótido nicotinamida adenina) producido por la deshidrogenasa en células metabólicamente activas. Los valores absolutos de absorbancia se correlacionaron directamente con la cantidad de células activas, para ello se compararon las células tratadas con las diferentes concentraciones de Ficoll PM70 frente a las células que no recibieron tratamiento.

### **3.19. Ensayo *ex vivo* de inhibición de la interacción virus-receptor celular**

Los ensayos se realizaron como se describió previamente (Mateu *et al.*, 1996), excepto que la incubación con los diferentes péptidos se realizó en ausencia o presencia de Ficoll 70 como agente aglomerante. Brevemente, células BHK-21c2 (80% de confluencia) sembradas en P60 fueron lavadas con DMEM completo e incubadas durante 45 min a t.a. con 180  $\mu\text{l}$  de PBS completo (con  $\text{Ca}^{2+}$  y  $\text{Mg}^{2+}$ ) o con concentraciones crecientes (0,1-100  $\mu\text{M}$ ) de los péptidos A15, A19 o A19-KLH diluidos en PBS completo, con o sin Ficoll 70. A menos que se indique lo contrario, la concentración final utilizada para el Ficoll 70 correspondió a 100 g/L. Luego, se adicionaron 20  $\mu\text{l}$  de una suspensión de virus y las células se incubaron durante 45 min a t.a.

La suspensión vírica utilizada contenía 100 PFU de VFA CS8-c1 (procedente de sobrenadante de cultivos infectados) diluido en PBS completo, a dos relaciones partícula física/partícula infectiva diferentes, de modo que se pudieran realizar los experimentos a valores distintos de la relación molar virus:receptor. Para conseguir una relación virus:receptor elevada era preciso aumentar el número de partículas víricas en el experimento sin aumentar el número de partículas infectivas. Para conseguirlo, se mezclaron cantidades apropiadas de una suspensión infecciosa de viriones y de una suspensión de viriones que habían sido completamente inactivados como se describió en los numerales 3.12.3 o 3.12.4. Asumiendo una relación partícula física/partícula infectiva de 10,000 para las preparaciones no inactivadas de VFA en nuestras condiciones, en los experimentos se usaron  $10^5$  o  $10^9$  de partículas físicas de virus y  $\sim 10^6$  células. Si se asume una cifra (un tanto conservadora) de  $10^3$  moléculas receptoras de integrina  $\alpha$ , por célula, las dos relaciones virus:receptor usadas habrían sido del orden de  $10^4$  y 1.

Transcurrido el tiempo de adsorción, las células se lavaron con DMEM, se añadió 0,5% de agar semisólido en medio DMEM con 2% de SFB y 1% de DEAE-dextrano y las placas se procesaron como se describió en el numeral 3.3.3. La actividad inhibitoria de los péptidos se comparó usando el valor de  $IC_{50}$ , definido como la concentración de inhibidor necesaria para reducir el número de placas de lisis al 50% del valor inicial.

### **3.20. Análisis de la estructura cristalográfica y modelado molecular de la cápsida de VFA, y análisis de conservación de su secuencia**

Para el análisis estructural de la cápsida de VFA se utilizaron las coordenadas atómicas obtenidas mediante cristalografía de rayos X para VFA C-S8c1 (Lea *et al*, 1994) y O<sub>1</sub>BFS (Acharya *et al*, 1989; Fry *et al*, 1999a) y almacenadas en el banco de datos de estructuras de proteínas (*Protein Data Bank*, PDB). Los modelos cristalográficos fueron examinados usando los programas de visualización *RasMol* (Sayle *et al*, 1995) y *Pymol* (DeLano Scientific, Inc). Los parámetros estructurales (tales como número y naturaleza de las interacciones entre átomos, accesibilidad al solvente de diferentes residuos aminoacídicos) se analizaron con el programa *Whatif* (Vriend, 1990). Para el análisis de interacciones entre residuos pertenecientes a diferentes subunidades de la cápsida se utilizaron las coordenadas de todos los pares posibles de subunidades que contactan con

diferente simetría en la cápsida (originalmente suministradas por la Prof. Nuria Verdaguer, Instituto de Biología Molecular de Barcelona). El modelado de mutaciones se realizó mediante el programa mediante el programa Pymol.

Para el análisis de conservación de secuencias se alinearon un total de 244 secuencias para la proteína VP1 de VFA y 250 secuencias para las proteínas VP2 y VP3 de VFA, utilizando las secuencias disponibles en el GenBank del NCBI (National Center for Biotechnology Information) y utilizando el programa de alineamiento múltiple *Clustal W* (EMBL-EBI).



## **RESULTADOS**





## 4. RESULTADOS

### 4.1. Caracterización bioquímica e inmunoquímica de viriones de VFA modificados racionalmente para incrementar su estabilidad frente a la disociación térmica

En la primera parte de esta tesis doctoral se ha continuado la investigación relacionada con la modificación de viriones de VFA mediante ingeniería de proteínas para incrementar, con fines vacunales, su resistencia a la disociación en subunidades por acción del calor (numeral 1.5). Al inicio de este trabajo, los tres virus más prometedores construidos previamente en nuestro laboratorio eran T2023C/A3145C, A2065H y D3069E/T2188A (Mateo, 2004; Mateo *et al.*, 2008; Luna, 2010). Cada uno de estos variantes es el resultado de la introducción de una sustitución de uno o dos aminoácidos por protómero, lo que en principio permite el establecimiento de 60 interacciones adicionales entre las subunidades pentaméricas que forman la cápsida.

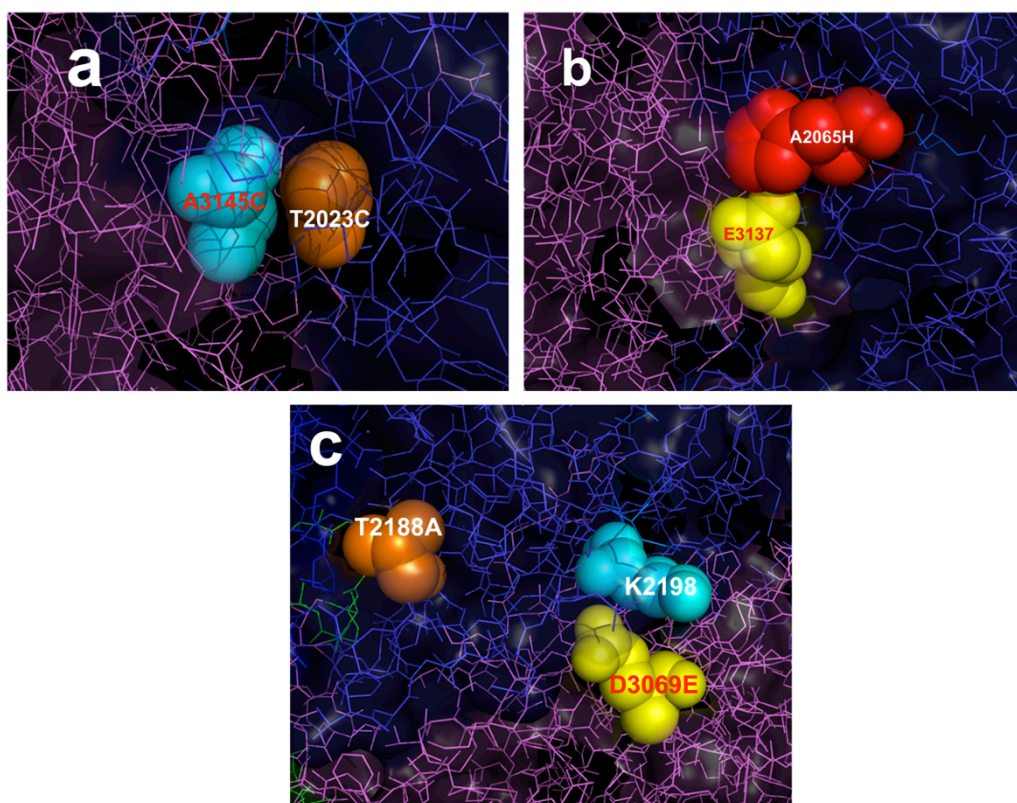
El variante T2023C/A3145C se diseñó para introducir pares de cisteínas próximas en las interfases entre pentámeros, de modo que pudieran formarse, en condiciones oxidantes, 60 puentes disulfuro interpentaméricos en el virión (**Figura 7a**). Este variante presentó una infectividad similar a la del virus parental, y los datos sugirieron que el puente disulfuro entre C2023 y C3145 estaba realmente formado en condiciones oxidantes (Luna, 2010); pero no se había determinado su estabilidad frente a la disociación térmica.

El variante A2065H se diseñó para introducir un grupo cargado positivamente que pudiera establecer una interacción iónica con el carboxilato de E3137 del pentámero vecino, de modo que pudieran formarse 60 nuevas interacciones electrostáticas interpentaméricas en el virión (**Figura 7b**). Este variante resultó viable, genéticamente estable y, en ensayos iniciales, físicamente más estable que el parental frente a su disociación en pentámeros por acción del calor.

El variante D3069E/T2188A fue el resultado de reemplazar el residuo D3069 por glutamato, de modo que el grupo carboxilato se acercara más al grupo amino de K2198 del pentámero vecino y pudiera establecer una interacción iónica fuerte, o incluso un puente

salino, resultando en un aumento en la fuerza de 60 interacciones electrostáticas interpentaméricas en el virión. Aunque la mutación D3069E fue letal, el virus recuperó una infectividad normal mediante la fijación de una mutación compensatoria T2188A (**Figura 7c**). Al igual que A2065H, el doble mutante D3069E/T2188A resultó viable, genéticamente estable y, en ensayos iniciales, físicamente más estable que el parental frente a su disociación en pentámeros por acción del calor.

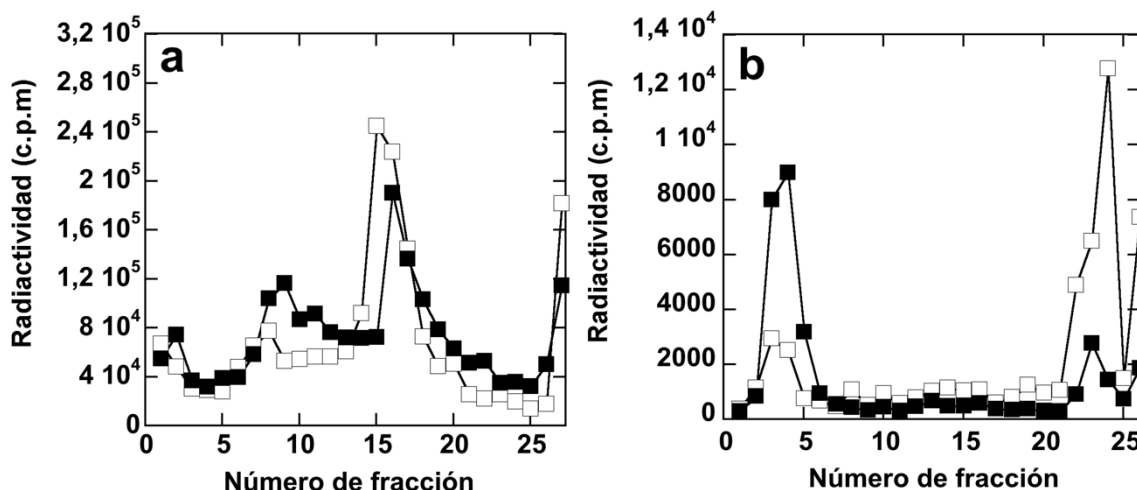
Como primer objetivo de este trabajo, nos planteamos evaluar o re-evaluar (según el caso), la estabilidad de estos tres VFA modificados, y además investigar diversos aspectos de su características bioquímicas e immunoquímicas que fueran de interés para el eventual desarrollo de vacunas termoestables contra la fiebre aftosa.



**Figura 7. Localización de mutaciones introducidas para aumentar la termoestabilidad del virión de VFA.** Se representan en modelo de varillas partes de dos subunidades pentaméricas vecinas (en azul y magenta, respectivamente) en la estructura de la cápsida de C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994). (a) variante T2123C/A3145C; (b) variante A2065H; (c) variante D3069E/T2188A. Se indican en modelo de van de Waals y diferentes colores los residuos sustituidos en estos tres variantes de VFA y, además, en (b) y (c), aquellos más próximos con los que podrían establecer interacciones electrostáticas atractivas (ver texto).

#### 4.1.1. Evaluación de la termoestabilidad de VFA T2023C/A3145C

En primer lugar se analizó la estabilidad del virión T2023C/A3145C frente a la disociación en pentámeros. Para ello, los viriones parental y mutante se marcaron radiactivamente y se purificaron en paralelo. En el último paso de purificación, una centrifugación en gradiente de sacarosa, el perfil de sedimentación de las preparaciones de virión parental y mutante fue similar aunque no idéntico (**Figura 8a**). En ambos casos se observó un pico mayoritario de viriones (coeficiente de sedimentación 140S, fracciones 16-18), pero en el caso del mutante apareció además un pico minoritario intermedio, con un coeficiente de sedimentación del orden del de la cápsida vacía (75S, fracciones 8-11). Las fracciones que contenían los viriones se mezclaron y se dializaron para eliminar la sacarosa, y esta preparación de viriones purificados, se realizó mediante una nueva centrifugación en gradiente de sacarosa (**Figura 8b**). Como se esperaba, la preparación de virión parental mostró un gran pico correspondiente a viriones (140S) y un pequeño pico correspondiente a pentámeros (coeficiente de sedimentación 12S), que proceden de la disociación de una fracción minoritaria de viriones purificados, durante su manipulación. Por el contrario, la preparación de virión mutante T2023C/A3145C mostró un pico minoritario de viriones y un gran pico de pentámeros (**Figura 8b**). Los resultados anteriores fueron reproducibles. Los viriones mutantes, por tanto, se disociaron casi completamente a pentámeros tras la diálisis. La cantidad originalmente obtenida de virión mutante fue similar a la de virión parental, a pesar de que antes de la purificación los viriones se encontraban en un medio sin sacarosa, y durante la purificación soportaron dos centrifugaciones. Estas observaciones indican que las mutaciones T2023C y/o A3145C debilitan grandemente la resistencia física de la partícula vírica en ausencia de otras proteínas y sacarosa y/o frente a un posible choque osmótico durante la diálisis para eliminar la sacarosa. Aunque no fue, en consecuencia, posible llevar a cabo el análisis cinético de la disociación térmica de este variante, los resultados obtenidos revelaron claramente que el virión T2023C/A3145C presenta una menor estabilidad física que el virión parental y sugieren que los puentes disulfuro no se han establecido o mantenido en las condiciones utilizadas para la preparación y análisis (a pesar de la ausencia de agentes reductores añadidos), por lo que no se continuó con su caracterización.



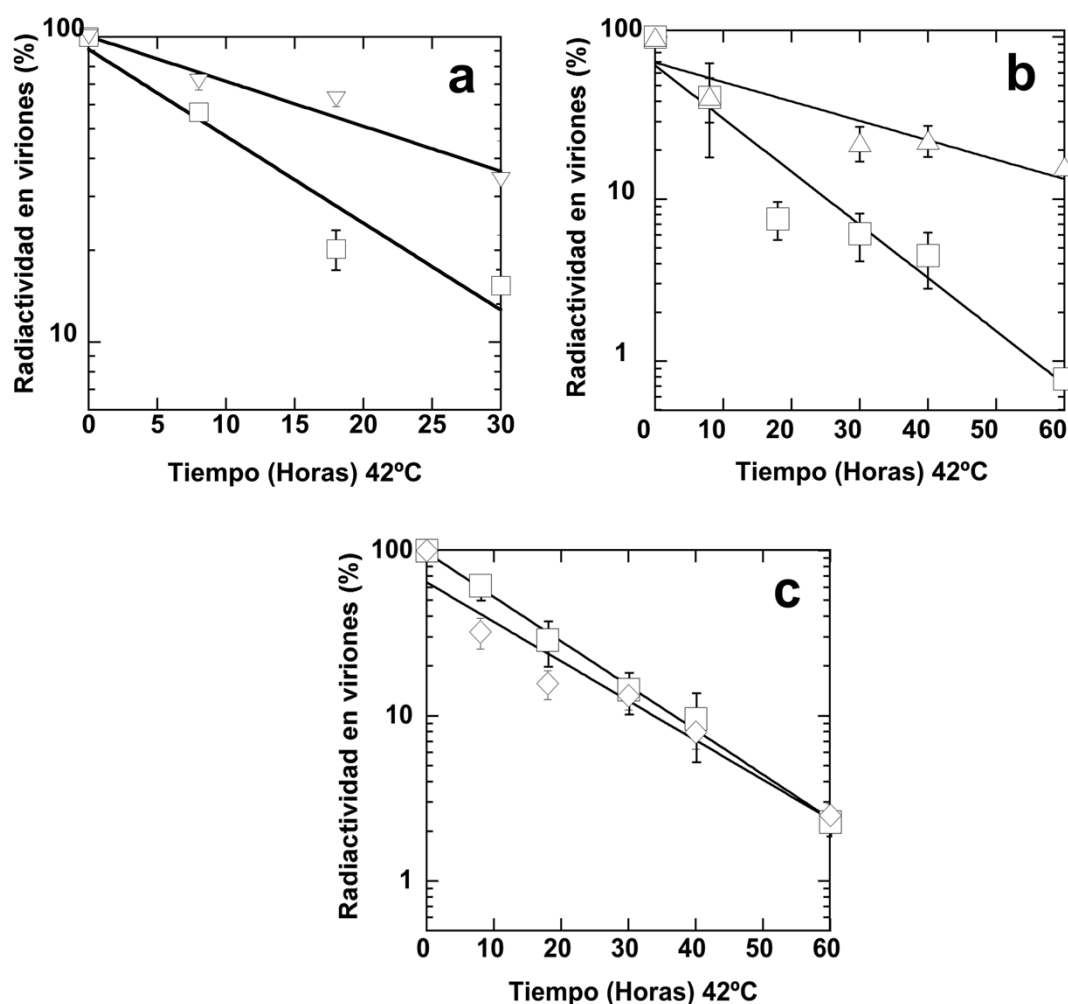
**Figura 8.** Perfiles de sedimentación en gradiente de sacarosa de preparaciones de viriones de VFA parental y mutante T2023C/A3145C. (a) Perfiles de sedimentación durante el último paso de purificación en gradiente de sacarosa. (b) Perfiles de sedimentación de la preparación purificada y dializada de viriones. Cuadrados blancos, virus parental; cuadrados negros, T2023C/A3145C. El pico de la derecha corresponde a viriones intactos (140S) y el pico de la izquierda corresponde a subunidades pentaméricas (12S).

#### 4.1.2. Caracterización bioquímica e inmunoquímica de VFA A2065H y VFA D3069E/T2188A

*Estabilidad de los viriones frente a la disociación en pentámeros por acción del calor.* De modo independiente de análisis previos realizados en nuestro grupo, evaluamos la estabilidad de los viriones variantes A2065H y D3069E/T2188A frente a su disociación a 42°C. Se obtuvieron y purificaron en paralelo viriones parentales y mutantes marcados radioactivamente (dos preparaciones independientes para cada uno de los variantes), y se determinó el porcentaje de viriones intactos en función del tiempo de incubación a 42°C (numeral 3.17.2). Como se esperaba del diseño realizado y de resultados previos, los dos variantes se disociaron en subunidades pentaméricas mucho más lentamente que el virus parental no mutado (**Figuras 9a y 9b**).

A partir de las cinéticas de disociación se determinaron las constantes de velocidad de disociación  $k$  a 42°C. Se obtuvo  $k_{mut} = 0,033 \text{ h}^{-1}$  para A2065H frente a  $k_{wt} = 0,065 \text{ h}^{-1}$  para el parental (obtenido y ensayado en paralelo); y  $k_{mut} = 0,027 \text{ h}^{-1}$  para D3069E/T2188A frente a  $k_{wt} = 0,075 \text{ h}^{-1}$  para el parental (obtenido y ensayado en paralelo). Estos valores fueron muy similares a los obtenidos previamente en nuestro laboratorio, y permitieron

confirmar fuera de toda duda que los VFA variantes A2065H y D3069E/T2188A son sustancialmente más resistentes a la disociación térmica que el virus parental natural, C-S8c1.



**Figura 9.** Cinética de disociación a 42°C para las variantes de VFA A2065H, D3069E/T2188A y A2065H/D3069E/T2188A. El porcentaje de viriones remanentes se presentan en escala logarítmica en función del tiempo de incubación. Todos los datos se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial de primer orden. (a) variante A2065H (triángulos invertidos) frente a virus parental (cuadrados); (b) D3069E/T2188A (triángulos) frente a virus parental (cuadrados); (c) triple mutante A2065H/D3069E/T2188A (diamantes) frente a virus parental (cuadrados). Los valores promedio y barras de error corresponden a la medición de dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las preparaciones de virus variante y su control con virus parental se realizaron y ensayaron en paralelo.

**Estudio del posible efecto aditivo de las mutaciones estabilizantes.** Con el objetivo de lograr un mutante de estabilidad incrementada en mayor medida que la de cada uno de los mutantes por separado, las tres mutaciones (A2065H y D3069E/T2188A) presentes en los

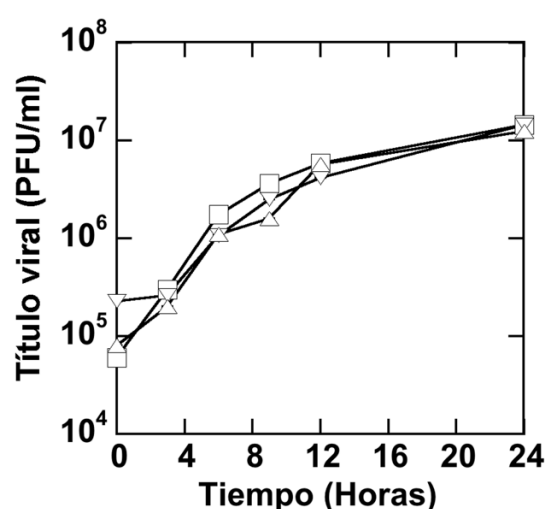
mutantes termoestables fueron introducidas conjuntamente en el clon infeccioso de VFA para obtener un triple mutante (A2065H/D3069E/T2188A). Se obtuvo su RNA vírico, se transfectaron las células susceptibles, y se determinó la infectividad de los virus producidos, en paralelo con la del virus parental. Los resultados mostraron que el triple mutante es viable, pero rindió títulos inferiores a los del parental, especialmente a tiempos más cortos tras la electroporación. A 45 h.p.e. los títulos de parental y mutante fueron  $4 \times 10^7$  y  $4 \times 10^5$ , respectivamente. Sin embargo, a 55 h.p.e., los títulos fueron mucho más parecidos,  $4,1 \times 10^7$  y  $8,5 \times 10^6$ , respectivamente. Estos resultados fueron reproducidos en diferentes experimentos. La secuenciación demostró que las tres mutaciones se encontraban presentes en el variante producido.

A continuación, los viriones que portaban la triple mutación fueron marcados radiactivamente, purificados y analizados en paralelo con los viriones parentales en ensayos de disociación térmica en función del tiempo de incubación a 42°C, como los realizados para los mutantes anteriores. Sorprendentemente, encontramos que el virión triple mutante no es significativamente más estable que el virión parental, presentando una  $k_{mut}=0,055 \text{ h}^{-1}$ , frente a la  $k_{wt}=0,062 \text{ h}^{-1}$  del parental en las condiciones del ensayo (**Figura 9c**). Este resultado ha sido reproducido en experimentos independientes. Por tanto, existe una cooperatividad negativa en la combinación de las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A.

A pesar de su falta de aditividad, las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A confieren por separado una elevada resistencia de la partícula vírica frente a la disociación por calor. Este tipo de estrategia de estabilización racional de VFA, mediante estas u otras mutaciones similares, podría tener una aplicación biotecnológica para mejorar la estabilidad térmica de las vacunas actuales contra la fiebre aftosa. Por lo tanto, consideramos de interés aplicado analizar si los viriones mutantes A2065H y D3069E/T2188A mantienen tres características importantes del virión: i) su cinética de producción viral; ii) su estructura antigénica; y iii) su inactivación por BEI sin que se altere su integridad física ni su estructura antigénica (BEI se utiliza típicamente para la inactivación de VFA en la producción de vacuna comercial contra la fiebre aftosa).

**Efecto de las mutaciones en la producción viral.** La elaboración de vacunas comerciales contra la fiebre aftosa involucra la producción de viriones a gran escala mediante infección de células susceptibles. Las mutaciones introducidas en una cepa vírica para mejorar sus

propiedades como vacuna no deben, por tanto, afectar de modo apreciable a la producción de viriones. Habíamos demostrado en el laboratorio que los variantes termoestables D3069E/T2188A y A2065H son capaces de producir títulos normales, pero era preciso determinar además si presentaban algún defecto que pudiera retrasar la producción de progenie viral (lo que sugeriría, además, una reducción de eficacia biológica). Para ello, se realizó un ensayo cinético de producción de partículas víricas para los dos variantes termoestables de VFA y el virus parental, utilizado éste como control en paralelo. Las cinéticas de producción de los virus mutantes fueron indistinguibles de la del virus parental C-S8c1 (**Figura 10**).

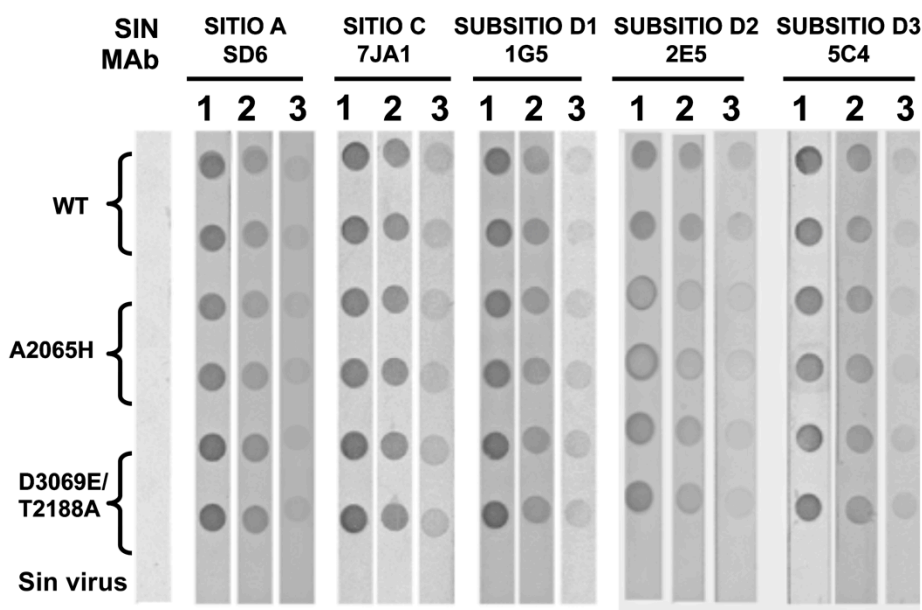


**Figura 10.** Cinética de producción de virus extracelular para VFA parental (cuadrados) y variantes A2065H (triángulos invertidos) y D3069E/T2188A (triángulos) en función del tiempo post-infección. Los valores corresponden al título viral (PFU/ml) de un experimento representativo.

**Especificidad antigénica de los mutantes termoestables.** Las mutaciones introducidas en una cepa vacunal no deben modificar su estructura antigénica, de modo que el virus variante vacunal pueda inducir y ser reconocido por los mismos anticuerpos que el parental. La estructura antigénica de VFA C-S8c1 parental, y virus de serotipo C en general, ha sido determinada con gran detalle, y se dispone de un amplio panel de MAbs dirigidos contra los diversos sitios antigénicos identificados (Mateu et al., 1987, 1989, 1990, 1994; Lea et al., 1994; Mateu, 1995; Mateu y Verdaguer, 2004). Se comparó, por tanto, la antigenicidad de los mutantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A con la del virus parental C-S8c1 en inmunoensayos, con un panel representativo de MAbs dirigidos contra nueve epítopos distintos, localizados en los cinco sitios antigénicos



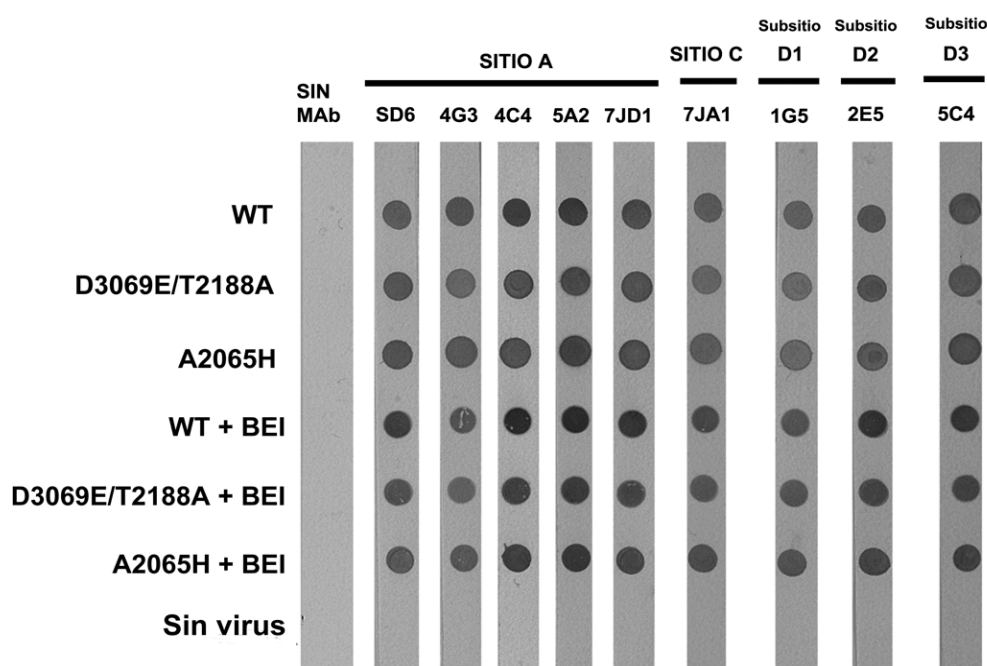
diferentes identificados en C-S8c1 (Mateu, 1995). Los MABs utilizados fueron SD6, 4G3, 4C4, 5A2, 7JD1 (sitio A), 7JA1 (sitio C), 1G5 (subsitio D1), 2E5 (subsitio D2) y 5C4 (subsitio D3). No se encontraron diferencias significativas en la reactividad de los mutantes termoestables y el virus parental con ninguno de los anticuerpos probados (**Figura 11**). Por tanto, las mutaciones estabilizantes introducidas no ejercieron un efecto detectable sobre la especificidad antigénica de VFA C-S8c1.



**Figura 11.** Reactividad del virus parental y variantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A con MABs dirigidos contra cada uno de los sitios antigénicos (A, C, D1, D2 y D3) en VFA de serotipo C. En cada una de las tiras sometidas a inmunoensayo, los tres virus fueron aplicados por duplicado. Como control negativo, se colocó sobrenadante de células BHK-21c2 no infectadas en el último pocillo (*sin virus*). La primera tira corresponde a un control negativo en la cual no se adicionó ningún MAb (*sin MAb*). En las demás tiras, los números 1, 2 y 3 indican diluciones seriadas por un factor de 10 para cada anticuerpo probado. Los resultados obtenidos con otros cuatro MABs que reconocen diferentes epítopos diferentes en el sitio antigénico A no se muestran en esta figura, siendo similares a los que se obtuvieron con el MAb SD6 que también reconoce un epítipo en el sitio A.

**Especificidad antigénica de los mutantes inactivados con BEI.** La completa inactivación de los viriones obtenidos para la producción de vacuna es un requerimiento crítico para asegurar la seguridad del producto vacunal. Uno de los métodos más utilizados es el tratamiento con BEI (Aarthi *et al.*, 2004). Este tratamiento no se espera que altere la integridad ni la especificidad antigénica del virus tratado. No obstante, era preciso confirmar que los variantes de VFA A2065H y D3069E/T2188A mantienen su integridad

y la especificidad antigénica del virus no mutado, incluso después del tratamiento con BEI. Este tratamiento inactivó completamente los tres virus, sin que afectará a la integridad física de las partículas víricas (resultados no mostrados). Además, el inmunoensayo con los 9 MAb que reconocen epítomos representativos en los 5 sitios antigénicos identificados en VFA C-S8c1, aplicado a preparaciones de viriones mutantes completamente inactivados con BEI, no mostró diferencias significativas con respecto al virus no mutado igualmente inactivado (**Figura 12**), ni tampoco respecto a los viriones no inactivados.



**Figura 12.** Reactividad del virus parental y variantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A, inactivados con BEI, con MAb dirigidos contra cada uno de los sitios antigénicos (A, C, D1, D2 y D3) en VFA de serotipo C. En cada una de las tiras sometidas a inmunoensayo, se aplicaron alícuotas de los tres virus sin inactivar o inactivadas con BEI (+BEI). Como control negativo, se colocó sobrenadante de células BHK-21c2 no infectadas en el último pocillo (*sin virus*). La primera tira corresponde a un control negativo en la cual no se adicionó ningún MAb (*sin MAb*).

En resumen, los resultados obtenidos en la primera parte de nuestro trabajo mostraron que los dos viriones de VFA modificados mediante ingeniería de proteínas A2065H y D3069E/T2188A son efectivamente mucho más estables que el parental frente a su disociación térmica, presentan cinéticas de producción extracelular similares a la del virus no mutado, y son antigénicamente indistinguibles del virus natural, tanto en su forma infecciosa como tras la inactivación completa mediante BEI (con fines vacunales).

Además, los resultados mostraron que las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A, a pesar de ejercer un efecto estabilizante por separado, cuando se combinan en un mismo virión se interfieren negativamente en cuanto a sus efectos estabilizantes, dando lugar a un triple mutante que no es significativamente más estable que el parental. Esta observación, junto a otras, sugiere la implicación de efectos alostéricos en la estabilidad de la partícula de VFA (ver Discusión).

### **4.2. Investigación de las bases moleculares del efecto termoestabilizante de las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A en el virión de VFA**

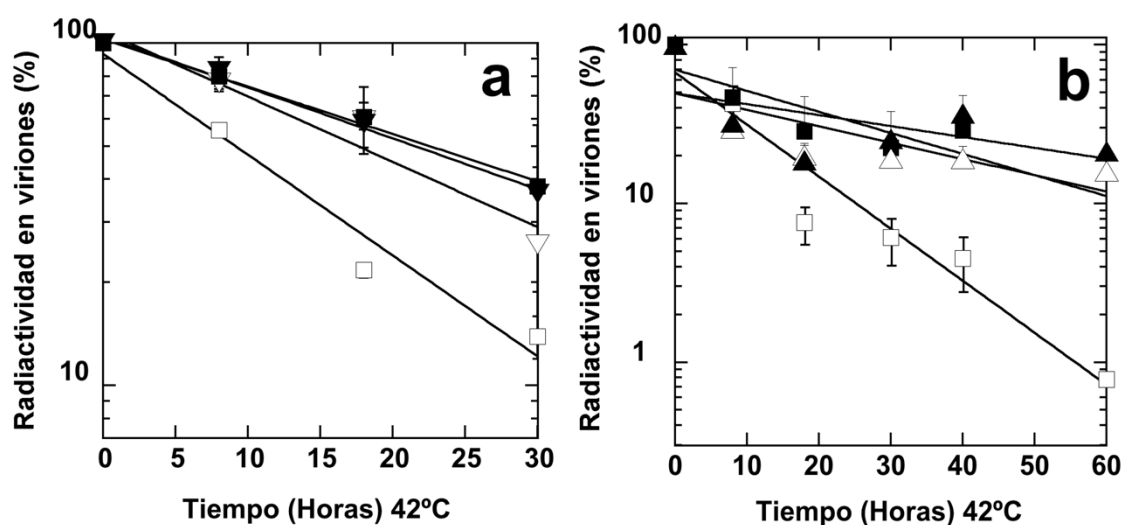
Los dos variantes termoestables de VFA, A2065H y D3069E/T2188A, se obtuvieron siguiendo una aproximación racional basada en la introducción de mutaciones para conseguir una mayor atracción electrostática entre subunidades pentaméricas en el virión. Ni para VFA ni para ninguna otra partícula vírica se había descrito antes su estabilización mediante un método racional basado en la modificación de interacciones no covalentes entre subunidades de la cápsida. Por tanto, era muy importante validar si la estabilización realmente conseguida es consecuencia del diseño racional seguido, o se debe a otra causa. Como segundo objetivo de este trabajo nos planteamos establecer experimentalmente el mecanismo molecular por el que las mutaciones introducidas en A2065H y/o D3069E/T2188A ejercen realmente su efecto estabilizante.

#### **4.2.1. Efectos de una fuerza iónica elevada sobre la estabilidad frente la disociación térmica de los variantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A y del virus parental**

El diseño racional de los mutantes termoestables A2065H y D3069E/T2188A estaba fundamentado en la introducción de un incremento en la atracción electrostática entre pentámeros. De ser este el caso, el apantallamiento de las cargas en presencia de una elevada fuerza iónica (conseguida mediante una elevada concentración de sal), debería reducir las diferencias de estabilidad relativa entre los virus mutantes y el virus parental, al neutralizarse las interacciones electrostáticas adicionales introducidas en los virus

modificados. Para comprobar este punto, los virus fueron marcados radiactivamente, purificados, y posteriormente incubados a 42°C durante diferentes intervalos de tiempo, bien a una fuerza iónica fisiológica (como control), o en presencia de una elevada concentración de sal (1 M de cloruro de sodio).

Los resultados (**Figura 13**) mostraron que, en presencia de 1 M NaCl, las diferencias de estabilidad entre los variantes A2065H y D3069E/T2188A y el virus no mutado observadas a fuerza iónica fisiológica fueron prácticamente abolidas, como era de esperar si una interacción electrostática está implicada en la termoestabilización. Sin embargo, y en contra de lo esperado, la presencia de una fuerza iónica elevada no desestabilizó los virus mutantes, sino que estabilizó en mucha mayor medida el virus parental respecto a los mutantes (**Figura 13**). Los valores obtenidos para las constantes de velocidad de disociación se indican en la **Tabla 6**. Estos resultados se reprodujeron en experimentos independientes y usando diferentes preparaciones, tanto del virus mutado como del no mutado.



**Figura 13.** Efecto de la fuerza iónica sobre la cinética de disociación a 42°C para VFA parental y variantes A2065H y D3069E/T2188A. El porcentaje de viriones remanentes se presentan en escala logarítmica en función del tiempo de incubación. Todos los datos se ajustaron a una ecuación de decaimiento exponencial de primer orden. (a) variante A2065H (triángulos invertidos) frente a virus parental (cuadrados); (b) D3069E/T2188A (triángulos) frente a virus parental (cuadrados). Los valores obtenidos a fuerza iónica fisiológica (0,15 M NaCl) o elevada (1 M NaCl) se indican mediante símbolos blancos o negros, respectivamente. Promedio y barras de error corresponden a la medición de dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. Las preparaciones de virus variante y virus parental se realizaron y ensayaron en paralelo.

**Tabla 6.** Constantes de velocidad de disociación  $k$  a 42°C para VFA parental y variantes A2065H y D3069E/T2188A a fuerza iónica normal (0,15 M NaCl) o elevada (1 M NaCl).

Virus	$k$ (h <sup>-1</sup> )	
	0,15 M NaCl	1 M NaCl
wt	0,067	0,031
A2065H	0,043	0,034
wt	0,075	0,031
D3069E/T2188A	0,023	0,015

Teniendo en cuenta que las interacciones entre pentámeros son esencialmente polares, estos resultados podían explicarse mediante la siguiente hipótesis: las mutaciones introducidas estabilizan la cápsida mediante el establecimiento de una mayor atracción electrostática *neta* entre pentámeros, como se esperaba en función del diseño realizado. Sin embargo, este efecto no se debería al establecimiento de nuevas interacciones culombianas atractivas entre residuos con cargas de distinto signo pertenecientes a pentámeros vecinos; sino a una reducción de una repulsión electrostática entre pentámeros que debe ocurrir en el virión parental *a pH neutro*, y que no ha sido descrita. La reducción de interacciones culombianas repulsivas entre residuos ácidos próximos a las interfases interpentaméricas, debida a las mutaciones A2065H o D3069E/T2188A, es la que conduciría a una mayor atracción electrostática *neta* entre pentámeros en los variantes termoestables. En el caso de A2065H en concreto, propusimos que el grupo imidazol cargado positivamente de la histidina introducida en posición 2065 establecería una interacción culombiana con el carboxilato de algún (o algunos) aspartato o glutamato espacialmente próximo, neutralizando total o parcialmente su carga negativa. Esto reduciría la repulsión culombiana entre este carboxilato y otro carboxilato de algún (o algunos) aspartato o glutamato espacialmente próximo y perteneciente a un pentámero vecino. El resultado neto sería un aumento de la estabilidad del virión frente a su disociación a pentámeros. Esta hipótesis ha sido sometida a verificación experimental, como se describe en el siguiente apartado.

#### 4.2.2. Efectos de mutaciones de residuos que puedan estar implicados en interacciones iónicas repulsivas en la cápsida de VFA sobre la estabilidad del virión frente a la disociación térmica

La hipótesis formulada al final del apartado anterior propone, en resumen, que el efecto estabilizante de la substitución A2065H se debe principalmente a la neutralización de la carga de algún aspartato o glutamato espacialmente próximo a la posición 2065 en la cápsida de VFA C-S8c1. Esta hipótesis realiza, por tanto, una predicción verificable experimentalmente: la eliminación de la carga de ese aspartato o glutamato en C-S8c1 mediante mutación isostérica a asparragina o glutamina (respectivamente), debería producir un efecto estabilizante similar al de la substitución A2065H.

***Diseño y construcción de VFA mutantes en los que se eliminan cargas negativas.*** Para verificar esta predicción, realizamos en primer lugar una inspección detallada de la estructura tridimensional de C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994), encaminada a identificar los aspartatos y glutamatos que se encuentran alrededor del residuo 2065 en el virión. Se fijó una distancia máxima de 15 Å entre ambos residuos. Esta distancia límite se eligió principalmente en base a un estudio teórico de van Vlijmen *et al.*, (1998). En este estudio se estableció que solamente los residuos a menos de 15 Å de la interfase de la cápsida de VFA podrían tener un efecto significativo sobre la desestabilización del virión debida a protonación de residuos y el establecimiento de repulsiones entre pentámeros a pH ácido.

De este modo, identificamos once residuos cargados negativamente (D2068, E2086, D2106, E2108, D3069, D3134, E3137, E3138, E3146, D3148 y D3195) alrededor de la posición 2065 (**Figura 14a**). En primer lugar, se analizó el entorno estructural de cada uno de esos residuos, su grado de exposición al solvente y las interacciones que establecen con sus vecinos, incluyendo; i) contactos de van der Waals (distancia límite 0,5 Å superior a la suma de los radios de van der Waals de los átomos implicados); ii) puentes de hidrógeno cadena lateral-cadena lateral o cadena lateral-cadena principal (distancia límite 3,5 Å); iii) puentes salinos estrictos (distancia límite 3,5 Å); iv) interacciones iónicas atractivas o repulsivas a corta o media distancia (**Tabla 7**).

Como era de esperar debido a su naturaleza polar y cargada, la mayoría de estos residuos (7 de los 11; D2068, E2086, D3069, D3134, E3137, E3138 y D3195) presentan su cadena lateral y, en concreto, su carboxilato, expuestos al solvente en la superficie del

virión. La cadena lateral de los cuatro restantes (D2106, E2108, E3146 y D3148) no se encuentra en el exterior de la cápsida (**Figura 14a** y **Tabla 7**). Las cadenas laterales de casi todos estos residuos (10 de 11) participan en interacciones de van der Waals, desde sólo 1-2 contactos hasta 6-12 contactos. Cuatro de ellas participan además en puentes de hidrógeno. De forma particularmente relevante para este estudio, los carboxilatos de los 11 residuos se encuentran a menos de 5 Å de grupos cargados positivamente (**Figura 14b**) y/o de otros carboxilatos (**Figura 14a**), por lo que pueden establecer interacciones coulombianas atractivas (formando o no puente salino) y/o repulsivas, de corto o medio alcance, dentro de un mismo pentámero y/o entre pentámeros vecinos. (**Tabla 7**).

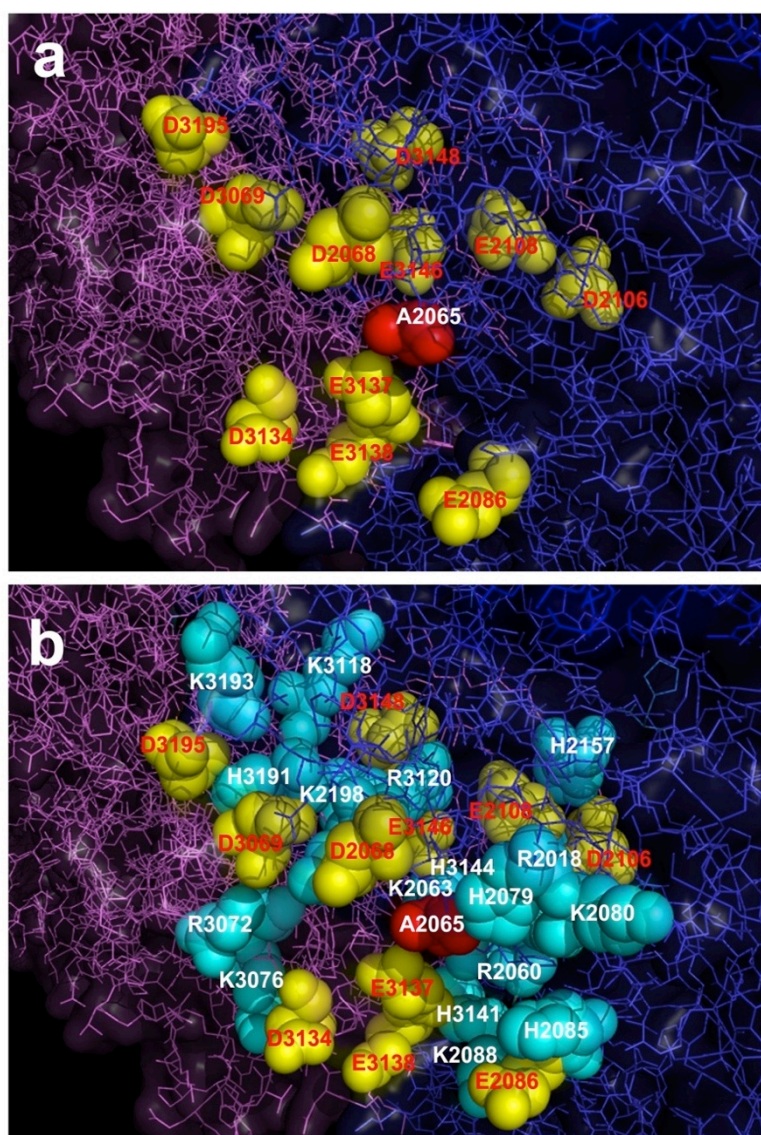
En resumen, en esta región de la cápsida de VFA parece existir una complicada distribución de potencial electrostático, como consecuencia de una red intrincada de interacciones coulombianas atractivas o repulsivas entre un buen número de grupos cargados. Estos se encuentran generalmente (aunque no en todos los casos) expuestos al solvente, y pertenecen a diferentes cadenas laterales, algunas de ellas implicadas en interacciones no covalentes adicionales intra- y/o interpentaméricas.

A continuación se reemplazaron individualmente sobre el clon infeccioso parental estos once residuos cargados negativamente (Asp o Glu) por sus isómeros neutros (Asn o Gln, respectivamente), como se describe en los numerales 3.5 y 3.7. Para el diseño de todos los mutantes se realizaron dos cambios de nucleótidos en el codón a mutagenizar, para evitar una fácil reversión al genotipo parental. Para llevar a cabo los análisis de los diferentes mutantes contamos con la colaboración técnica y experimental de la Lic. Alicia Rodríguez Huete de nuestro laboratorio.

### ***Efecto de las mutaciones de eliminación de carga negativa sobre la infectividad de VFA.***

El efecto de las mutaciones realizadas sobre la viabilidad del virus y la producción de progenie se analizó mediante electroporación de células BHK-21c2 con cantidades iguales de ARN vírico obtenido a partir de los clones moleculares, incluyendo en cada experimento el ARN infeccioso obtenido del clon parental como control positivo. La progenie viral producida se cuantificó a tres tiempos post-electroporación mediante titulación. Los datos fueron normalizados y se expresaron como infectividad relativa (cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el virus no mutado) (**Tabla 8**).





**Figura 14.** Residuos cargados alrededor de la posición 2065 en la cápsida de VFA C-S8c1. Se representan en modelo de varillas partes de dos subunidades pentaméricas vecinas (en azul y magenta, respectivamente) en la estructura de la cápsida de C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994). (a) Se representan en modelo de van de Waals el residuo A2065 (rojo) y los once residuos ácidos situados a una distancia máxima de 15 Å de A2065 (amarillo). (b) Se representan en modelo de van der Waals los mismos residuos que en (a) y, además, los residuos básicos situados en la misma región (cian).

Ocho de los 11 mutantes (D2068N; E2086Q; D2106N, E2108Q; D3134N; E3137Q; E3138Q y D3195N) presentaron títulos similares al virus parental a 45 h.p.e. Dos variantes (E3146Q y D3148N) presentaron una drástica reducción en la infectividad en dos o más ordenes de magnitud a 45 h.p.e., aunque mantuvieron un tamaño de placa comparable al virus parental. Ambos variantes recuperaron parcialmente su infectividad a tiempos largos h.p.e., y completamente una vez fueron amplificados en células BHK-21c2 a las 24 h.p.i. El mutante D3069N no generó progenie viral detectable en ninguno de los tiempos post-infección evaluados (Tabla 8).



**Tabla 7.** Interacciones de los residuos ácidos situados alrededor de la posición A2065 en la cápsida de VFA C-S8c1.

Residuo	Puente salino <sup>a</sup>	Otros residuos cargados <sup>a</sup>	Puentes de hidrógeno <sup>a</sup>	Contactos de van der Waals <sup>b</sup>	Cadena lateral expuesta <sup>c</sup>
D2068		K2198	1mc(Q2073)	6	Sí
E2086		H2085		1	Sí
		K2088			
D2106		E2108	2sc(H2157, T2159)	2	No
		H2157	1mc(2x2204)		
E2108		D2106	3sc(2xS2024, N2202)	8	No
		H2157			
		E3146			
D3069	K2198	E3138		3	Sí
D3134		H3191		2	Sí
E3137	H3141	K2063		1	Sí
E3138		K2217			Sí
		D3134			
		H3141			
E3146	R3120	H3144		12	No
	K2063	D2106			
D3148	R3120		1mc(Q2027)	12	No
D3195	H3191	K3193		1	Sí
		D3197			

<sup>a</sup> Para los puentes de hidrógeno y los puentes salinos la distancia límite es de 3,5 Å. Para las otras interacciones carga-carga (*otros residuos cargados*) la distancia entre cargas es superior a 3,5 Å pero inferior a 5 Å. sc: cadena lateral; mc: cadena principal.

<sup>b</sup> Distancia límite: 0,5 Å superior a la suma de los radios de van der Waals de los átomos considerados.

<sup>c</sup> Se indica si la cadena lateral está expuesta, orientada hacia la superficie de la cápsida.

Tras la amplificación de las progenies de los 11 mutantes se secuenció toda la región de la cápsida (P1), para confirmar la presencia de la mutación introducida y determinar si había ocurrido alguna otra mutación. Se obtuvieron viriones de 45 h.p.e. y 55 h.p.e., se extrajo el ARN vírico, se convirtió en ADN de cadena doble y se amplificó, y se determinó la secuencia de P1 (numerales 3.9, 3.10 y 3.11). Nueve de los 11 residuos mostraron la presencia de la mutación introducida, sin ninguna mutación acompañante en toda la región de la cápsida. El mutante D3148N presentó una pseudoreversión, a través de un único cambio de nucleótido en el codón, originalmente mutado en dos posiciones, que se tradujo en la sustitución por el aminoácido original no mutado. El mutante E3137Q se transfectó en dos ocasiones. En una ocasión no se recuperó progenie viral. En la otra

transfección se obtuvo un título normal y se conservó la mutación introducida, pero se fijó además una mutación secundaria F3111V, que probablemente fue la responsable de restaurar la infectividad ejerciendo un efecto compensatorio. En los demás mutantes no ocurrió reversión ni se fijó ninguna mutación secundaria.

En resumen, 9 de las 11 mutaciones isostéricas analizadas que eliminan cargas negativas alrededor de la posición 2065 en el virión de VFA C-S8c1 son viables, aunque E3146Q y D3148N producen una reducción significativa de infectividad, y la última revirtió durante la amplificación del virus. Las mutaciones D3069N, E3137Q son deletéreas, aunque el efecto de E3137Q, al menos, puede compensarse mediante la fijación de una mutación secundaria.

**Tabla 8.** Efecto sobre la infectividad de VFA de la eliminación de cargas negativas alrededor de la posición 2065 en la cápsida.

Mutante	Nº de cambio de nucleótidos <sup>a</sup>	Infectividad relativa <sup>b</sup>			Mutación secundaria adquirida <sup>c</sup>
		45 h.p.e	55 h.p.e	93 h.p.e	
wt	-	1	1	1	
D2068N	2	0,41	0,91	-	
E2086Q	2	1,30	1,32	-	
D2106N	2	0,56	0,07	-	
E2108Q	2	0,74	3,38	0,66	
D3069N	2	Letal	Letal	Letal	
D3134N	2	1,88	1	-	
E3137Q	2	1,65	2,09	-	F3111V
E3138Q	2	0,49	0,41	-	
E3146Q	2	0,0001	0,0007	0,03	
D3148N	2	0,0087	0,0155	0,14	Pseudoreversión (N3148D)
D3195N	2	1,43	2,00	-	

<sup>a</sup> Se indica el número de nucleótidos sustituidos.

<sup>b</sup> La infectividad relativa es el cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control parental no mutado en el mismo experimento.

<sup>c</sup> Se determinó la secuencia de nucleótidos de la progenie producida a 45 h.p.e. y 55 h.p.e. Se indican los casos en que se encontraron cambios de secuencia diferentes de la mutación primaria introducida.

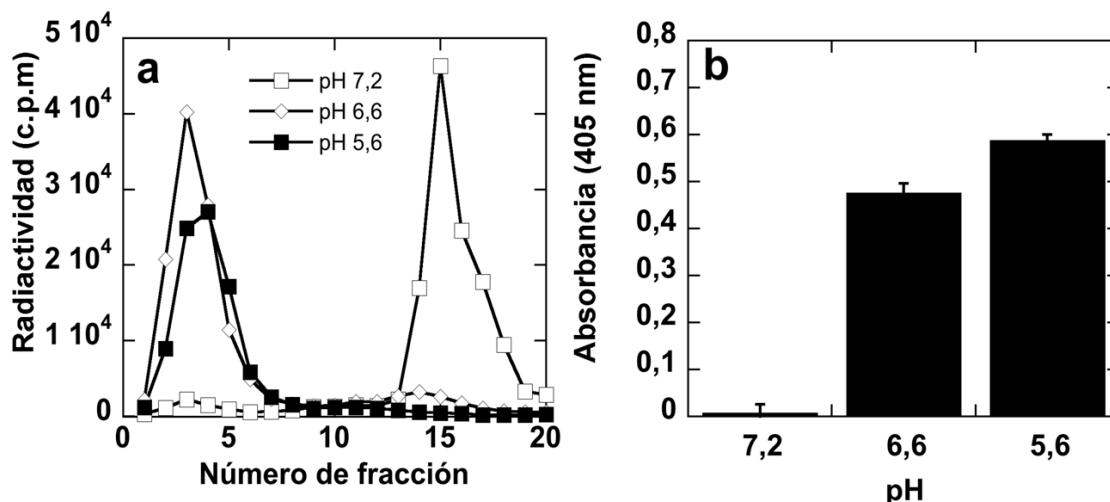
***Puesta a punto de un método inmunoquímico basado en ELISA para la determinación de la estabilidad de VFA frente a su disociación en subunidades.*** Hasta el momento, nuestro método estándar para la determinación de la estabilidad de viriones de VFA frente a su disociación era la preparación y purificación de viriones marcados radiactivamente, su incubación durante diferentes tiempos en condiciones disociantes, y la determinación

directa de la cantidad de viriones íntegros remanentes en cada caso mediante ultracentrifugación y conteo de la radiactividad asociada con el pico de viriones (numeral 3.12.1). Este es un método complicado y lento, implica el uso de isótopos radiactivos, y limita las posibilidades de purificación y análisis (para evitar contaminaciones de ciertos aparatos, por ejemplo). El método resulta particularmente poco conveniente si, como en el presente caso, se trata de determinar la estabilidad de un gran número de viriones mutantes.

Para poder llevar a cabo análisis de estabilidad de VFA mutantes de una forma rápida y eficiente, hemos puesto a punto y validado un método inmunoquímico de ensayo basado en un ELISA en *sandwich* (ver descripción detallada en el numeral 3.17.3). La clave de este ensayo es la utilización de un reactivo derivado de un anticuerpo de dominio único (VHH), VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> (numeral 3.17.3), el cual reconoce específicamente pentámeros de VFA, pero no reacciona con proteínas individuales, protómeros o cápsidas completas (Harmsen *et al.*, 2007, 2008, 2010, 2011). Este reactivo fue obtenido por el grupo del Dr. Michiel Harmsen (Central Veterinary Institute, Universidad de Wageningen, Holanda), y ha sido amablemente suministrado por el Dr. Harmsen. El método se basa en la cuantificación inmunoquímica de la cantidad de pentámero presente en una muestra de viriones de VFA purificados e incubados, por ejemplo, en presencia de cantidades crecientes de un agente disociante, o durante diferentes tiempos. Inicialmente, la cantidad de pentámeros corresponde a la pequeña cantidad presente en la preparación de viriones purificados utilizada (tomada como valor 0% de disociación en el ensayo), y esta cantidad aumenta en función de la concentración de disociante o tiempo de incubación hasta alcanzar una meseta en el valor máximo (tomado como valor 100% de disociación).

Para poner a punto y validar este ensayo analizamos en primer lugar el desensamblaje inducido por pH de viriones de VFA C-S8c1, comparando los resultados obtenidos mediante el ensayo de ELISA en *sandwich* con los obtenidos mediante el método basado en la ultracentrifugación de viriones marcados. Se realizaron estrictamente en paralelo dos purificaciones, una de viriones marcados, y la segunda de viriones no marcados. Los viriones purificados fueron incubados durante 30 min a t.a. con una solución de tampón fosfato salino a tres diferentes pHs (5,6, 6,6 y 7,2). Posteriormente, los viriones marcados se analizaron mediante ultracentrifugación (**Figura 15a**) y los no

marcados mediante ELISA (**Figura 15b**). Los porcentajes de disociación a cada pH obtenidos por los diferentes métodos (**Tabla 9**) resultaron muy similares.



**Figura 15.** Validación de un ELISA en *sandwich* para la determinación de la estabilidad de viriones de VFA frente a la disociación a diferentes pH. (a) Perfiles de sedimentación en gradiente de sacarosa de una preparación de viriones marcados radiactivamente, purificados, e incubados durante 30 min en tampón fosfato a pH 7,2 (cuadrados blancos); pH 6,6 (diamantes) y pH 5,6 (cuadrados negros). El pico de la derecha del perfil corresponde a viriones intactos (140S) y el pico de la izquierda corresponde a subunidades pentaméricas (12S) producto de la disociación del virión. (b) reactividad en ELISA con VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> (específico para pentámeros) de una preparación de viriones no marcados, purificados en paralelo con la preparación utilizada en (a), e incubados a los mismos pH en las mismas condiciones. Los valores promedio y barras de error corresponden a cuatro réplicas en un experimento representativo. Los resultados fueron reproducidos en dos experimentos independientes.

Como segunda aproximación para validar el ensayo de ELISA *sandwich*, analizamos la cinética de desensamblaje a pH neutro y 42°C de viriones de VFA parental y variante A2065H, comparando los resultados obtenidos mediante ELISA con los obtenidos mediante el método basado en la ultracentrifugación de viriones marcados. De nuevo, se realizaron estrictamente en paralelo dos purificaciones, una de viriones marcados, y la segunda de viriones no marcados, tanto para el parental como para A2065H. Tras su incubación a 42°C durante diferentes tiempos, los viriones marcados se analizaron mediante ultracentrifugación (**Figura 16a**) y los no marcados mediante ELISA (**Figura 16b**). Los dos métodos de análisis rindieron resultados similares, confirmando la validez del ensayo de ELISA y la observación de que el variante A2065H es sustancialmente más resistente que el parental frente a la disociación térmica.

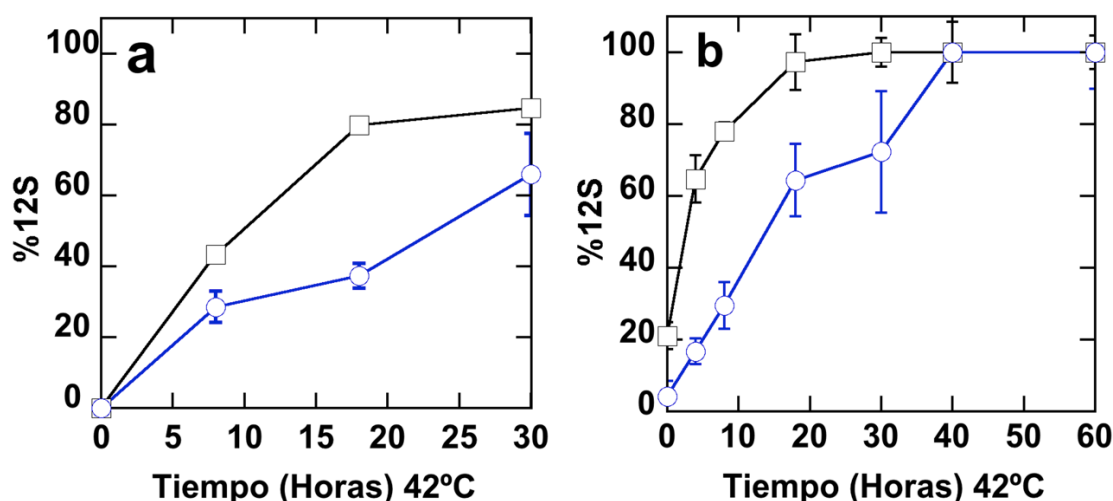
**Tabla 9.** Porcentaje de viriones de VFA remanentes tras incubación a diferentes pH, obtenidos mediante ELISA *sandwich* o marcaje radiactivo y centrifugación.

pH <sup>a</sup>	%140S	
	Marcaje Radiactivo <sup>b</sup>	ELISA <i>sandwich</i> <sup>c</sup>
7,2	100	99
6,6	9	19
5,6	0	0

<sup>a</sup> pH a los que se incubó el virus.

<sup>b</sup> Porcentaje de virión remanente a cada pH, obtenido mediante el método de marcaje radiactivo y centrifugación.

<sup>c</sup> Porcentaje de virión remanente a cada pH, obtenido mediante el método de ELISA *sandwich* (ver texto).



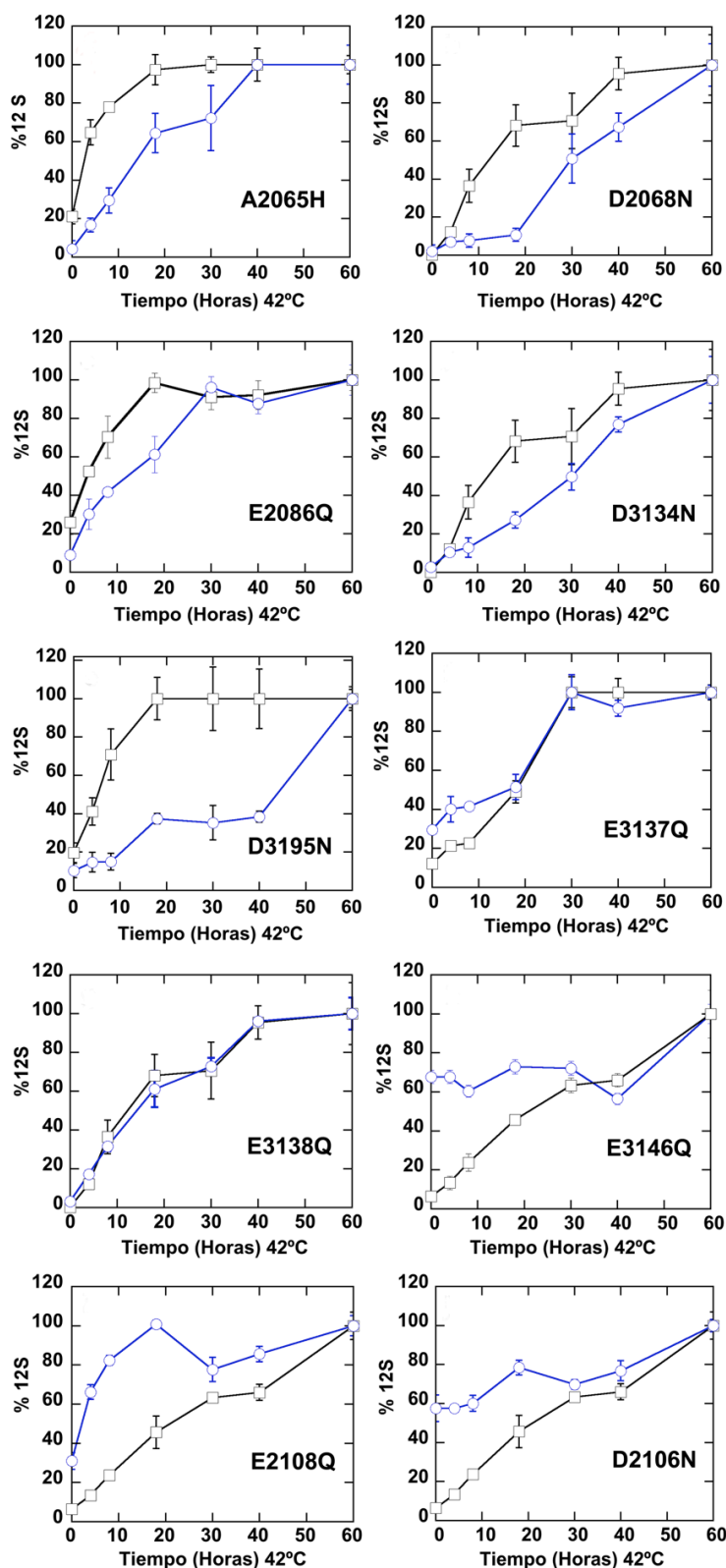
**Figura 16.** Validación de un ELISA en *sandwich* para la determinación de la estabilidad de viriones de VFA frente a la disociación a diferentes pH. Cinéticas de disociación a 42°C de viriones en pentámeros, determinada mediante marcaje y centrifugación (a), o ELISA (b). Se indica en cada caso el % de viriones que se ha disociado en pentámeros. Virión parental, cuadrados negros; variante A2065H, círculos azules. En (b), los valores promedio y barras de error corresponden a cuatro réplicas en un experimento representativo. Los resultados fueron reproducidos en dos experimentos independientes.

En resumen, el método de ELISA puesto a punto en este trabajo suministra una nueva alternativa, sencilla y adecuada, para determinar la estabilidad de viriones de VFA frente a su disociación en pentámeros.

***Efecto de las mutaciones que eliminan cargas negativas en la estabilidad térmica del virión frente a su disociación en pentámeros.*** Una vez puesto a punto y validado el método de ensayo basado en ELISA en *sandwich*, analizamos la estabilidad frente a la disociación de 9 variantes de VFA, de los 11 construidos (D2068N, E2086Q, D2106N, E2108Q, D3134N, E3137Q/F3111V, E3138Q, E3146Q y D3195N). Excluimos de nuestro análisis los variantes D3069N y D3148N, el primero porque la mutación resultó letal, y el segundo porque es genéticamente inestable y se obtuvo un revertiente (a nivel de aminoácido). En el caso de E3137Q/F3111V, la mutación secundaria F3111V restauró la viabilidad perdida por la mutación primaria E3137Q, pero no la carga negativa eliminada por ésta, y por lo tanto era igualmente válido para el objetivo propuesto. Los viriones variantes elegidos se produjeron en gran escala y se purificaron, y su estabilidad térmica frente a disociación en pentámeros, relativa a la estabilidad del virión parental, se determinó mediante el ensayo de ELISA puesto a punto y validado en este trabajo.

Los resultados obtenidos (**Figura 17**) revelaron que cuatro de los variantes analizados (D2068N, E2086Q, D3134N, D3195N) son sustancialmente más estables que el virión. Dos de los variantes (E3137Q, E3138Q) presentan una estabilidad similar a la del virión parental. Los tres variantes restantes (E3146Q, E2108Q, D2106N) son más inestables, observándose además en estos tres casos hasta un 60% de disociación a pentámeros antes de someterlos a calentamiento (**Figura 17**). Todos estos resultados han sido reproducidos utilizando dos purificaciones independientes de cada mutante, y analizando cada uno en varios experimentos independientes; la **Figura 17** muestra experimentos representativos.

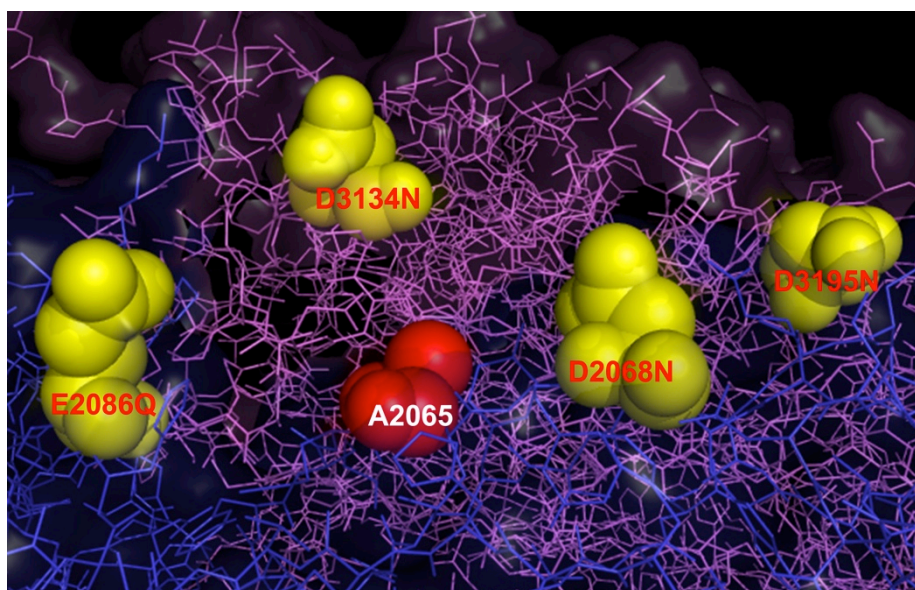
Las mutaciones de eliminación de carga negativa que resultaron en un aumento en la termoestabilidad de VFA frente a la disociación afectan, en todos los casos, a residuos con su cadena lateral en la superficie del virión, orientada hacia el exterior y expuesta al solvente (**Figura 18**). Por el contrario, todas las mutaciones que no aumentaron, o incluso redujeron, la termoestabilidad afectan a residuos con su cadena lateral enterrada en la pared de la cápsida (ver Discusión).



**Figura 17.** Efecto de la eliminación de cargas negativas alrededor de la posición 2065 sobre la estabilidad de VFA frente a su disociación en pentámeros.

Cada gráfica muestra las cinéticas de disociación en pentámeros de una preparación del virión variante indicado (círculos, línea azul) y de una preparación de virión parental purificado y ensayado en paralelo con el variante (cuadrados, línea negra). Se expresa el porcentaje de disociación del virión en pentámeros en función del tiempo de incubación a 42°C. El valor de absorbancia en el ensayo correspondiente a 100% de disociación de determinó mediante la incubación del virión parental durante 60 h a 42°C. Los valores promedio y barras de error corresponden a cuatro réplicas para cada tratamiento de un experimento representativo. Los resultados fueron reproducidos en dos experimentos independientes.





**Figura 18.** Localización en la cápsida de VFA de las cuatro mutaciones que estabilizan VFA mediante eliminación de un carboxilato. Los residuos implicados se representan en modelo de van de Waals y color amarillo. Como referencia, el residuo A2065 se indica en rojo. La superficie del virión queda en la parte superior de la figura.

El conjunto de los resultados de esta segunda parte del presente trabajo demuestra que en el virión de VFA en condiciones fisiológicas de fuerza iónica y pH cercano a la neutralidad, existen fuertes repulsiones electrostáticas entre pentámeros. Estas repulsiones se reducen en presencia de una fuerza iónica elevada, que apantalla las cargas del mismo signo implicadas en la repulsión. La eliminación mediante mutación isostérica de la carga negativa de algunos carboxilatos expuestos al solvente y cercanos a las interfases entre pentámeros y al residuo A2065 (D2068, E2086, D3134, D3195) reduce las repulsiones con otros residuos ácidos próximos, aumenta de modo neto la fuerza de interacción entre pentámeros y, por tanto, aumenta la estabilidad del virión frente a la disociación. Estos resultados apoyan la hipótesis de que la mutación A2065H incrementa la termoestabilidad del virión frente a su disociación porque introduce una carga positiva que neutraliza en parte el exceso de carga negativa en esa región de la cápsida (del mismo modo que lo hace una elevada fuerza iónica o la eliminación de algunos carboxilatos vecinos). En resumen, los resultados demuestran la existencia de repulsiones culombianas entre pentámeros en VFA incluso a pH neutro, apoyan fuertemente la hipótesis de que la mutación estabilizante A2065H actúa neutralizando en parte las cargas negativas causantes de la repulsión entre



pentámeros, y han permitido obtener mediante un método enteramente racional nuevos variantes de VFA con una mayor termoestabilidad frente a la disociación.

### **4.2.3. Evaluación del efecto sobre el virión de la combinación de las mutaciones presentes en los variantes termoestables basados en la eliminación de interacciones electrostáticas entre subunidades**

La siguiente pregunta que nos hicimos es si la eliminación de una sola carga negativa por protómero era suficiente para eliminar completamente la repulsión entre pentámeros en el virión de VFA. Si no lo era, la eliminación de una segunda carga negativa permitiría aumentar aún más la estabilidad del virión. Para analizar este punto, se construyeron variantes con una doble o triple mutación, mediante combinaciones de las mutaciones estabilizantes D2068N, E2086Q, D3134N y D3195N. Se obtuvieron cinco dobles mutantes: D2068N/E2086Q, D2068N/D3134N, D2068N/D3195N, E2086Q/D3134N y E2086Q/D3195N y dos triples mutantes, D2068N/E2086Q/D3134N y D2068N/E2086Q/D3195N. Las mutaciones fueron introducidas conjuntamente en el clon infeccioso de VFA, se obtuvo el RNA vírico, se transfectaron células susceptibles y se determinó, en primer lugar, la infectividad de estos mutantes (**Tabla 10**). Cuatro de los variantes dobles presentaron un título similar al virus parental a las 45 o 55 h.p.e, y únicamente el variante D2068N/E2086Q presentó una reducción en la infectividad de unos dos ordenes de magnitud, que se recuperó una vez fue amplificado en células BHK-21c2. La secuenciación mostró en todos los casos la presencia de las mutaciones introducidas y la ausencia de mutaciones secundarias.

Una vez comprobamos que estos nuevos virus variantes son infecciosos, los viriones que portaban una doble mutación fueron purificados y sometidos a calentamiento a 42°C para evaluar su termoestabilidad frente a la disociación en pentámeros mediante el ensayo de ELISA en *sandwich* (**Figura 19**). Los resultados mostraron que tres de los variantes dobles (D2068N/E2086Q, D2068N/D3134N, E2086Q/D3195N) son más estables que el virus parental, pero no más estables que los variantes sencillos correspondientes. El variante E2086Q/D3134N resultó ser más inestable que el virus parental, y el variante E2086Q/D3195N se disoció completamente a pentámeros durante el último paso de purificación y diálisis (resultado no mostrado). Estos resultados han sido reproducidos en

experimentos independientes. Por tanto, concluimos que la eliminación de más de un carboxilato en la región alrededor del residuo 2065 no produce un efecto aditivo sobre la estabilización del virión sino que, por el contrario, produce un efecto de algún modo interferente.

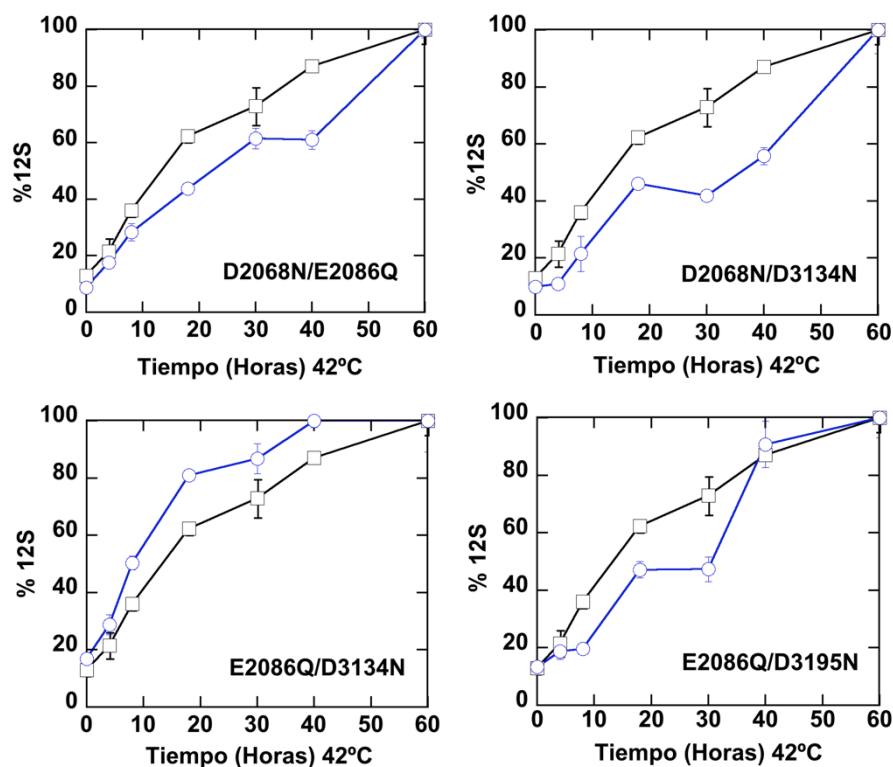
**Tabla 10.** Efecto sobre la infectividad de VFA de la eliminación simultánea de dos o más cargas negativas alrededor de la posición 2065 en la cápsida.

Virus	Nº de cambio de nucleótidos <sup>a</sup>	Infectividad Relativa <sup>b</sup>	
		45 h.p.t.	55 h.p.t.
wt	-	1	1
D2068N/E2086Q	4	0,003	0,023
D2068N/D3134N	4	0,773	0,410
D2068N/D3195N	4	1,136	0,900
E2086Q/D3134N	4	1,409	0,400
E2086Q/D3195N	4	2,568	0,920
D2068/E2086Q/D3195N	6	0,455	0,909
D2068/E2086Q/D3134N	6	0,341	0,270

<sup>a</sup> Se indica el número de nucleótidos sustituidos.

<sup>b</sup> Se obtuvieron los títulos virales a los 45 y 55 h.p.e. La infectividad relativa es el cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control parental no mutado en el mismo experimento.

Los dos triples mutantes contruidos también fueron infecciosos, presentando un título similar al del virus parental a las 45 y 55 h.p.e (Tabla 10). No obstante, en base a los resultados obtenidos con los dobles mutantes, decidimos no analizar la estabilidad de los triples mutantes, ya que, seguramente los efectos estabilizantes de estos tampoco serán aditivos. Estamos considerando realizar mutantes dobles que contengan las mutación estabilizante A2065H y alguna de las cuatro mutaciones estabilizantes que eliminan un carboxilato cercano a A2065. Si el efecto estabilizante de la mutación A2065H se debe a que neutraliza una carga negativa próxima, como indican los resultados obtenidos, no esperamos que el doble mutante correspondiente sea más estable que cualquiera de los dos sencillos.



**Figura 19.** Efecto sobre la estabilidad de VFA frente a su disociación en pentámeros de la eliminación simultánea de dos cargas negativas alrededor de la posición 2065 en la cápsida. Cada gráfica muestra las cinéticas de disociación en pentámeros de una preparación del virión variante indicado (círculos, línea azul) y de una preparación de virión parental purificado y ensayado en paralelo con el variante (cuadrados, línea negra). Se expresa el porcentaje de disociación del virión en pentámeros en función del tiempo de incubación a 42°C. El valor de absorbancia en el ensayo correspondiente a 100% de disociación de determinó mediante la incubación del virión parental durante 60 h a 42°C. Los valores promedio y barras de error corresponden a cuatro réplicas para cada tratamiento de un experimento representativo. Los resultados fueron reproducidos en dos experimentos independientes.

#### 4.3. Construcción y caracterización de cápsidas vacías recombinantes de VFA modificadas mediante ingeniería de proteínas para incrementar su estabilidad frente a la disociación térmica

El desarrollo de cápsidas vacías recombinantes de VFA como vacunas contra la fiebre aftosa no ha sido posible aún, en parte porque estas cápsidas se obtienen con dificultad y en muy pequeñas cantidades (Roosien *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991; Abrams *et al.*, 1995; Mason *et al.*, 2003; Grubman, 2005; Li *et al.*, 2008). Pero, además, la cápsida vacía de VFA es aún más inestable que el virión (Curry *et al.*, 1997), por lo que el uso de

cápsidas vacías como vacunas, aun si se resuelve el problema de su baja expresión, requerirá muy probablemente su estabilización frente a la disociación térmica. La caracterización de los variantes termoestables de VFA A2065H y D3069E/T2188A (numeral 4.1) y los nuevos variantes termoestables obtenidos en esta tesis doctoral (numeral 4.2) nos permiten afirmar que es posible obtener, mediante diseño y técnicas de ingeniería de proteínas, viriones de VFA que presentan mayor estabilidad frente a la acción del calor. Como tercera parte de este trabajo, nos planteamos si algunas de estas mismas mutaciones podrían estabilizar la cápsida vacía de VFA.

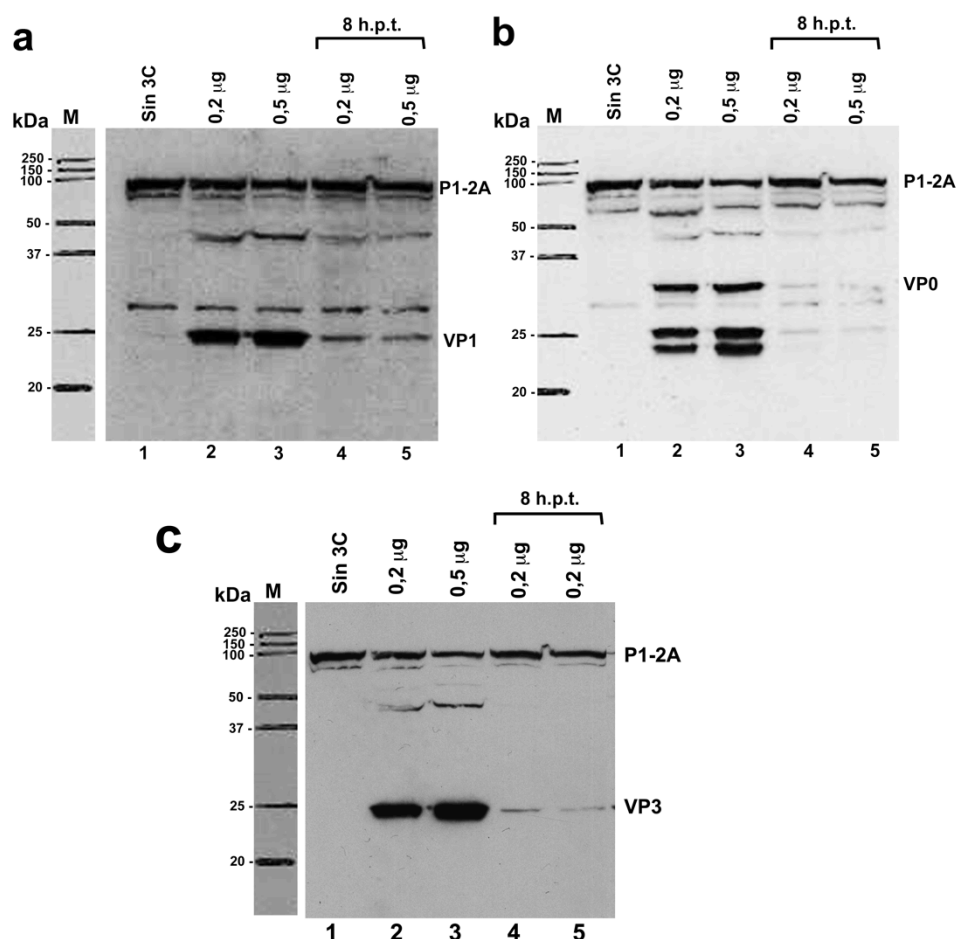
#### **4.3.1. Puesta a punto de un sistema de expresión y purificación de cápsidas vacías de VFA C-S8c1 basado en virus vaccinia recombinante**

**Expresión de cápsidas vacías.** En primer lugar, era necesario poner a punto en el laboratorio un sistema de expresión de cápsidas vacías del virus utilizado como parental en este estudio, VFA C-S8c1. La expresión de cápsidas vacías recombinantes de VFA C-S8c1 se realizó mediante el sistema de expresión basado en virus vaccinia recombinante (numeral 3.13). Para ello se contó con el suministro de plásmidos recombinantes y la ayuda técnica por parte de la Prof. Encarnación Martínez Salas (CBMSO) y del Dr. Graham Belsham (National Veterinary Institute, Technical University of Denmark). Células BHK-21c2 infectadas con el virus vaccinia recombinante vT7f3 fueron transfectadas con los plásmidos PL1-1 y pSKRH-3C (Belsham *et al.*, 2000). El plásmido PL1-1 contiene la secuencia de P1 (2193 nt) del serotipo C de VFA y los primeros 18 nt de la proteasa 2A (P1-2A). El plásmido pSKRH-3C expresa la proteasa 3C del serotipo A10 de VFA, la cual es capaz de procesar P1 de diferentes serotipos, incluyendo el serotipo C.

Estudios previos habían reportado que la proteasa 3C de VFA es tóxica en diferentes tipos celulares (Lewis *et al.*, 1991; Martínez-Salas y Domingo, 1995). Por tanto, para poner a punto el sistema de expresión se determinó el momento más adecuado en el que se expresaría 3C para llevar a cabo el procesamiento de P1-2A, minimizando la importancia de su efecto citotóxico sobre las células. Para ello, las células BHK-21c2 infectadas con vT7f3 fueron co-transfectadas con PL1-1 (2 µg) y pSKRH-3C probando dos concentraciones de éste (0,2 o 0,5 µg). Alternativamente, las células fueron transfectadas primero con pL1-1, y 8 horas más tarde con pSKRH-3C (numeral 3.13.1). Entre las 16 y

20 h.p.t., se recogieron las células, se prepararon extractos celulares, y éstos analizaron mediante SDS-PAGE y Western Blot utilizando MAbs SD6 (que reconoce P1 (90 kDa), VP1 (24 kDa), pentámeros y cápsidas completas de VFA), 4A3 (que reconoce P1, VP0 (33 kDa), VP2 (25 kDa), pentámeros y cápsidas completas de VFA) y 6F6 (que reconoce P1 (90 kDa), VP3 (24 kDa), pentámeros y cápsidas completas de VFA) .

Los resultados (**Figura 20**) mostraron que P1-2A de C-S8c1 se expresa y procesa correctamente cuando se cotransfectan PL1-1 y pSKRH-3C, en las dos concentraciones analizadas. Cuando se transfectó primero con PL1-1 y a las 8 h con pSKRH-3C, se observó un procesamiento ineficaz de P1-2A. Como se esperaba, no ocurrió procesamiento de P1-2A en ausencia de 3C.



**Figura 20. Expresión y procesamiento de P1-2A de VFA C-S8c1.** Extractos de células BHK-21c2 infectadas con vT7f3 y transfectadas con PL1-1 en ausencia (pocillo 1) o presencia (pocillos 2-5) de dos cantidades diferentes (0,2 µg y 0,5 µg) de pSKRH-3C transfectado junto a PL1-1 (pocillos 2 y 3) o 8 h.p.t. (pocillos 4 y 5) fueron analizados por SDS-PAGE y Western Blot utilizando el MAb SD6 (a), el MAb 4A3 (b) o el MAb 6F6 (c). M: marcadores de peso molecular preteñidos. Se indican los pesos moleculares de los marcadores en kDa, y la posición de P1-2A, VP1, VP0 y VP3.

**Purificación de cápsidas vacías.** Se probaron diferentes métodos para tratar de purificar las cápsidas vacías recombinantes de VFA expresadas. A continuación se enumeran los diferentes métodos ensayados (ver numeral 3.13.3).

- a) Colchón de sacarosa al 20% seguido de gradiente de sacarosa (del 7,5 al 45% o del 7,5 al 30%).
- b) Colchón de sacarosa al 20% seguido de dos gradientes de sacarosa sucesivos (del 7,5 al 45%).
- c) Colchón de sacarosa al 20%, gradiente de sacarosa (del 7,5 al 30%) y gradiente de densidad (cloruro de cesio).
- d) Colchón de sacarosa al 20% y gradiente de densidad (cloruro de cesio).
- e) Colchón de sacarosa y cromatografía de filtración en gel de *Sephacryl S-500 HR* o *S-1000 HR* (GE Healthcare).
- f) Cromatografía de filtración en gel de *Sephacryl S-500 HR* y gradiente de sacarosa (del 7,5% al 30%).
- g) Cromatografía de filtración en gel de *Sephacryl S-500 HR*, gradiente de densidad (cloruro de cesio) y gradiente de sacarosa (del 7,5 al 30%).
- h) Colchón de sacarosa al 20%, gradiente de sacarosa (del 7,5 al 30%), gradiente de densidad (cloruro de cesio) y finalmente cromatografía de afinidad, utilizando una matriz *AffiGel 10* (BioRad), a la cual se unió covalentemente el anticuerpo VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> para eliminar de la preparación de cápsidas los pentámeros no ensamblados y los producidos por la disociación de parte de éstas durante el proceso de purificación (numeral 3.13.3).
- i) Purificación con colchón de sacarosa al 20%, gradiente de sacarosa (del 7,5 al 30%), gradiente de densidad (cloruro de cesio) y adsorción de pentámeros en bolas magnéticas (*Dynabeads M-280 Tosyl-activated*, Invitrogen) a las cuales se les unió covalentemente el anticuerpo VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub> (numeral 3.13.3).

En cada uno de los pasos intermedios de purificación se analizaron las fracciones obtenidas mediante SDS-PAGE y Western Blot utilizando el MAb SD6. Las fracciones que contenían cápsidas vacías se mezclaron, se dializaron frente a PBS, y se concentraron,

en su caso (numeral 3.13.4). El análisis del producto final en cada caso se realizó mediante SDS-PAGE y Western Blot y microscopía electrónica por tinción negativa.

En general, en las preparaciones realizadas se observaron partículas esféricas con un diámetro entre 25-30 nm, que corresponden a cápsidas vacías, aunque contaminadas con una gran cantidad de estructuras circulares con un diámetro entre 5-10 nm, que corresponden a pentámeros (**Figura 21a**). En ocasiones se observaron también contaminantes de alto peso molecular (**Figura 21b**). La dificultad para la purificación de las cápsidas vacías estriba principalmente en el bajo nivel de expresión y, sobre todo, en su gran inestabilidad física. Las cápsidas vacías de VFA tienden a disociarse muy fácilmente a pentámeros, incluso a 4°C y durante todo el relativamente lento proceso de purificación. A pesar de que al menos uno de los pasos de purificación en cada procedimiento seguido (a-i) separa los pentámeros presentes en la preparación, después se producen más pentámeros por disociación de una parte de las cápsidas, como pudo comprobarse mediante microscopia electrónica.

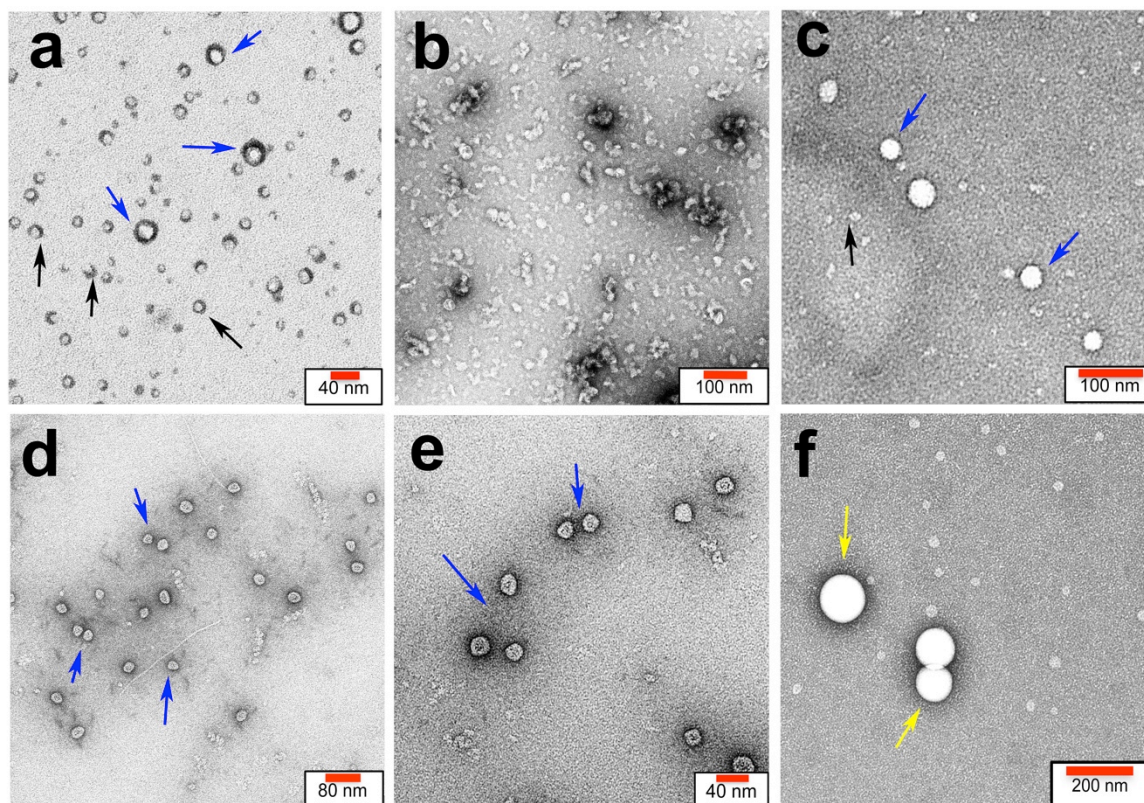
El método con el cual obtuvimos los mejores resultados correspondió al método h. En este caso se obtuvo una preparación notablemente pura de cápsidas vacías (**Figuras 21d y 21e**). la concentración y cantidad de cápsidas obtenidas se estimó utilizando una mezcla de bolas de látex de 112 nm de diámetro en concentración conocida y cápsidas (numeral 3.13.5) (**Figura 21f**). La preparación realizada con el método h rindió una concentración de  $1,9 \times 10^{12}$  cápsidas/ml y una cantidad total de aproximadamente  $2 \times 10^{12}$  cápsidas. Con otros métodos se obtuvieron menores concentraciones y cantidades. Por ejemplo, la preparación realizada con el método g utilizando cantidades de partida similares a las utilizadas para la preparación anterior por el método h rindió una concentración de sólo  $5,3 \times 10^9$  partículas/ml y una cantidad total igualmente reducida. El procedimiento h, aún siendo el mejor hasta la fecha, no ha resultado adecuadamente reproducible por el momento, por lo que continuamos trabajando sobre este aspecto.

### **4.3.2. Construcción, purificación y análisis de la estabilidad térmica de cápsidas vacías recombinantes de VFA A2065H y D3069E/T2188A**

Una vez confirmamos que podíamos sintetizar y purificar razonablemente cápsidas vacías de VFA en cantidades analíticas, introdujimos mediante mutagénesis dirigida las



mutaciones A2065H y D3069E/T2188A en la secuencia de P1 contenida en el plásmido PL1-1. Las dos P1-2A mutantes se expresaron en el sistema de vaccinia en un nivel semejante al de la P1-2A parental (que se llevó como control positivo durante todo el proceso de expresión y purificación), y se procesaron en niveles similares a los de ésta (**Figura 22**).

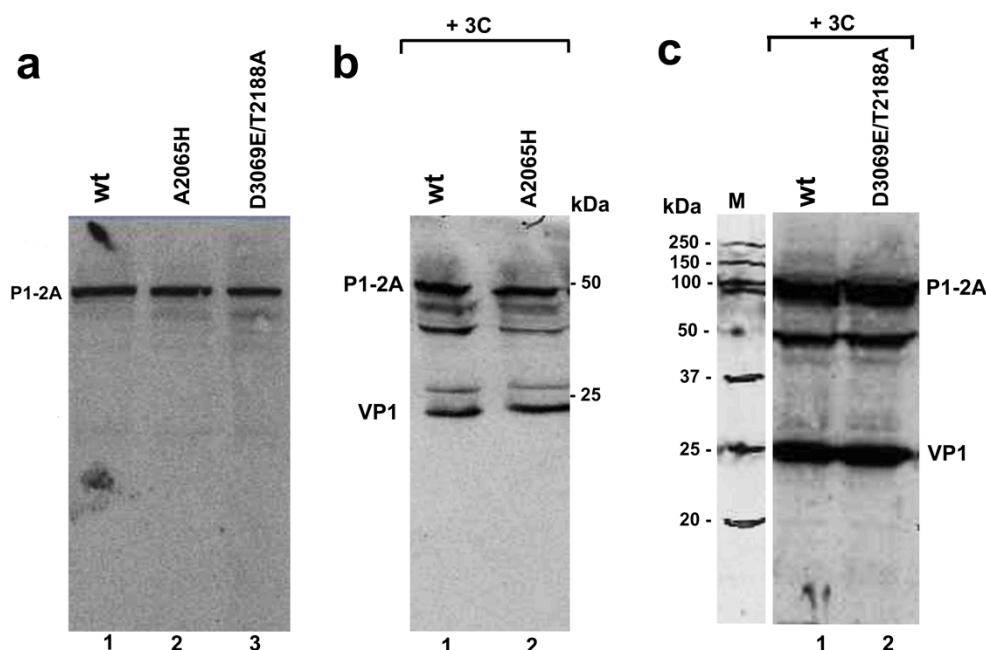


**Figura 21.** Preparaciones de cápsidas vacías de VFA C-S8c1 analizadas mediante microscopia electrónica. Las flechas azules señalan alguna cápsida vacía, las flechas negras algún pentámero. (a) preparación realizada mediante el procedimiento i; (b) preparación mediante el procedimiento a; (c) preparación mediante el procedimiento c; (d) y (e) preparación mediante el procedimiento e, visualizada a dos aumentos diferentes; (f) mezcla de cápsidas vacías y bolas de látex visualizada a menor aumento (las flechas amarillas señalan bolas de látex). Las barras en el ángulo inferior derecho de cada imagen indican la escala correspondiente (diferente para cada imagen).

Las cápsidas expresadas, parental y mutantes, se purificaron parcialmente en paralelo mediante el procedimiento a. Las fracciones que contenían las cápsidas vacías (75S) fueron mezcladas y dializadas. El análisis mediante electroforesis y Western Blot (utilizando el MAb SD6) de las preparaciones mostró en todos los casos la presencia de cápsidas (coeficiente de sedimentación 75S. Para el variante A2065H no se detectaron pentámeros



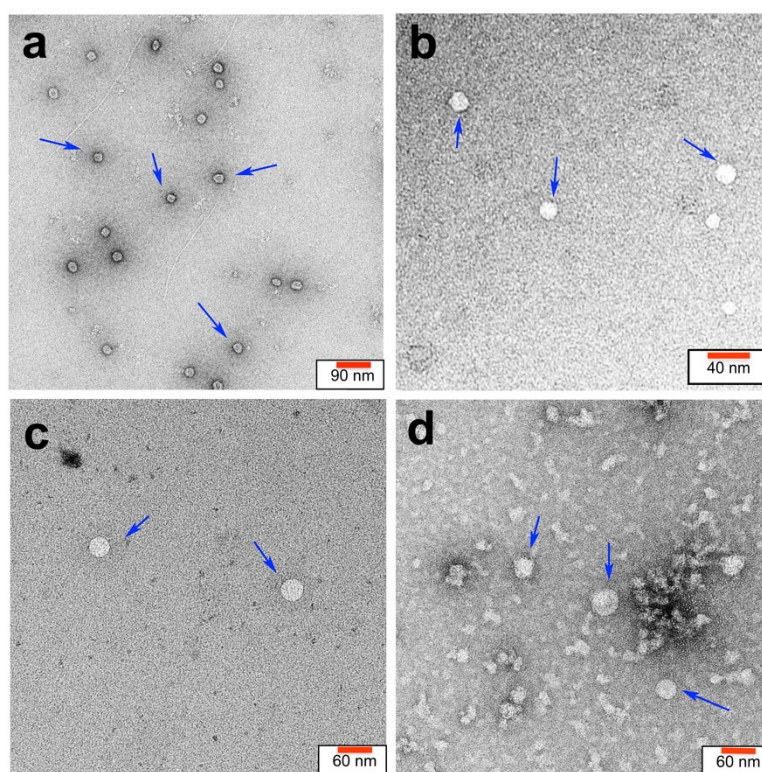
contaminantes, aunque sí se observó una cierta proporción de pentámeros en el caso del variante D3069E/T2188A (resultados no mostrados). La visualización mediante microscopía electrónica (**Figuras 23b, 23c y 23d**), reveló en los tres casos densidades similares de estructuras esféricas entre 25-30 nm que corresponden a cápsidas vacías de VFA. Las imágenes fueron comparadas con una de las preparaciones de referencia de cápsidas vacías de VFA altamente purificadas mediante el método h (**Figura 23a**), para comparar su tamaño y morfología, que resultaron indistinguibles.



**Figura 22.** Procesamiento de la poliproteína P1-2A por la proteasa 3C en las variantes A2065H y D3069E/T2188A expresados mediante el sistema basado en virus vaccinia recombinante. Los extractos celulares fueron analizados por Western Blot utilizando el MAb SD6, específico para la proteína VP1. El ensayo se realizó esencialmente como se describió en el numeral 3.17.4. (a) células BHK-21c2 infectadas con vT7f3 y transformadas con PL1-1 wt (pocillo 1), PL1-1 A2065H (pocillo 2) o PL1-1 D3069E/T2188A (pocillo 3) en ausencia de 3C. (b) células BHK-21c2 infectadas con vT7f3, transformadas con PL1-1 wt (pocillo 1) o con PL1-1 A2065H (pocillo 2) y co-transfectadas con 3C (+3C). (c) células BHK-21c2 infectadas con vT7f3, transformadas con PL1-1 wt o con PL1-1 D3069E/T2188A y co-transfectadas con 3C (+3C). M son marcadores de peso molecular preteñidos; se indican los correspondientes pesos moleculares en kDa.

A continuación se analizó la estabilidad térmica relativa de las cápsidas vacías variantes frente a la de la cápsida parental. El bajo rendimiento y la dificultad de purificación completa desaconsejaba utilizar el método del marcaje radiactivo. Estas razones y la inestabilidad de las cápsidas vacías impidieron asimismo obtener resultados claros mediante el método de ELISA (puesto a punto en este trabajo para determinar la

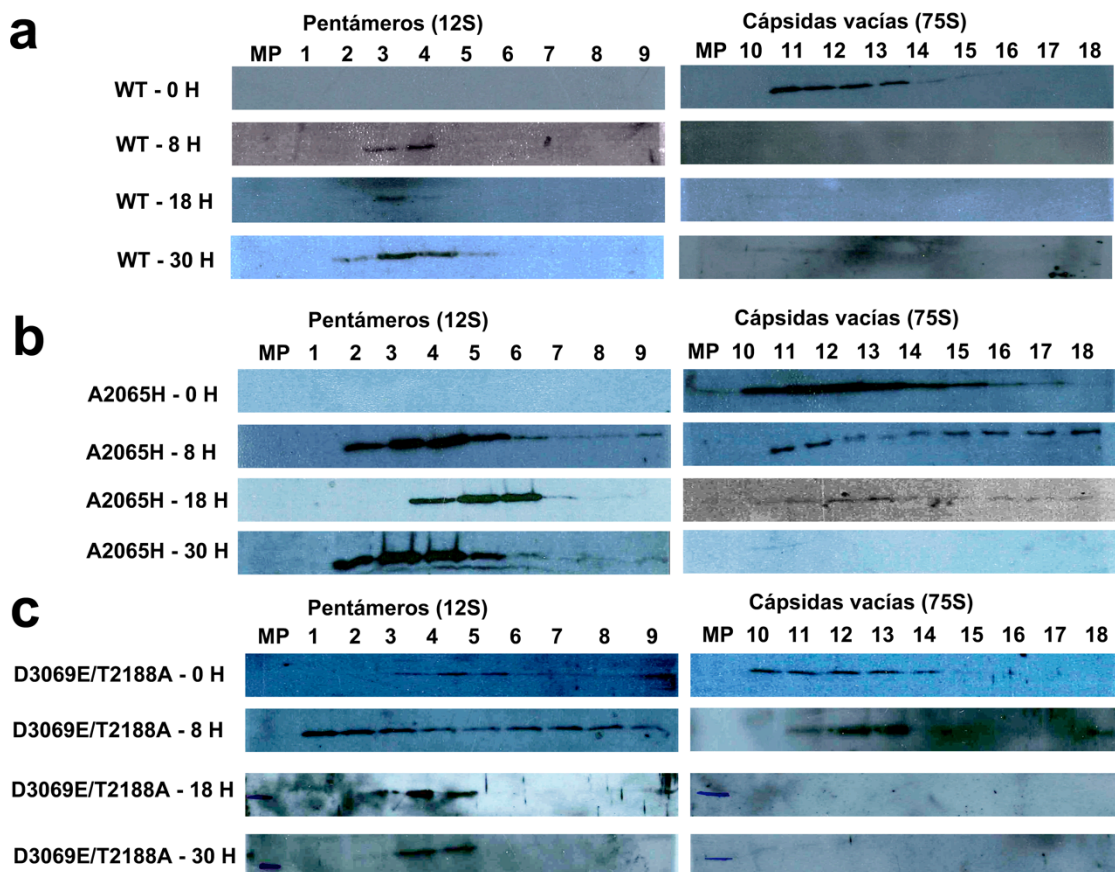
estabilidad de viriones, numeral 3.17.3), a pesar de que se intentó repetidamente. Por tanto, se decidió poner a punto un método diferente para cuantificar la cantidad relativa de cápsidas tras el ensayo de disociación térmica. Este método se ha basado en la determinación de la cantidad remanente de cápsidas vacías mediante ultracentrifugación, pero no utilizando marcaje radiactivo, sino mediante inmunodetección (numeral 3.17.4). Cada fracción se analizó por SDS-PAGE y Western Blot usando el MAb SD6, y se densitómetró la banda específica de VP1 en las fracciones alrededor de un coeficiente de sedimentación 75S, correspondiente a cápsidas vacías íntegras, y en aquellas alrededor de un coeficiente de sedimentación 12S, correspondiente a pentámeros (**Figura 24**).



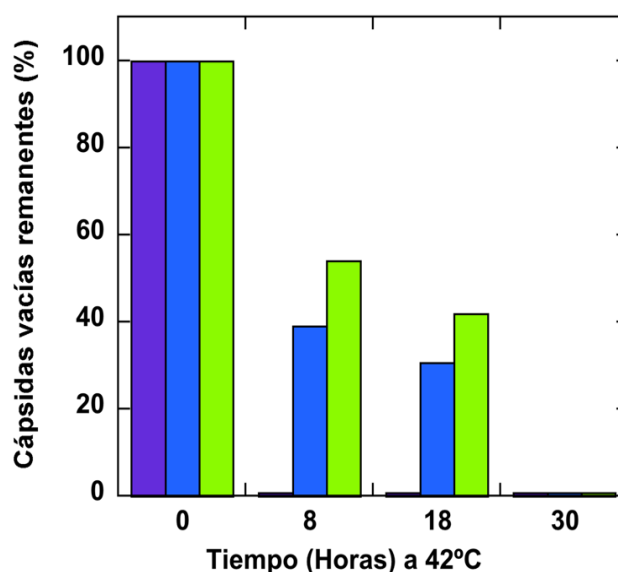
**Figura 23.** Visualización por microscopia electrónica de cápsidas vacías variantes A2065H y D3069E/T2188A. (a) cápsidas vacías parentales obtenidas mediante el método h. (b, c, d), cápsidas vacías de VFA parcialmente purificadas, obtenidas mediante el método a. (b) cápsidas vacías parentales; (c) cápsidas vacías variantes A2065H; (d) cápsidas vacías variantes D3069E/T2188A. Para todos los paneles en flechas de color azul señalan algunas cápsidas vacías de VFA (diámetro estimado 25-30 nm). Las barras en el ángulo inferior derecho de cada imagen indican la escala correspondiente (diferente para cada imagen).

Los valores obtenidos mediante densitometrado (expresados como unidades de densidad óptica por milímetro cuadrado (D.O./mm<sup>2</sup>)) se normalizaron para dar el porcentaje de cápsidas vacías remanentes, tomando como valor de referencia (100%) la sumatoria del

valor correspondiente a cápsidas íntegras y el correspondiente a cápsidas disociadas a pentámeros, para cada uno de los tiempos evaluados (**Figura 25**). Los resultados mostraron que las cápsidas variantes A2065H y D3069E/T2188A son mucho más resistentes frente a su disociación en pentámeros que la cápsida parental. Tras 8 h de incubación ya no quedaban cápsidas vacías parentales, mientras que aproximadamente el 40% y el 55% de las cápsidas vacías A2065H y D3069E/T2188A, respectivamente, aún mantenían su integridad. Incluso tras 18h de incubación aún permanecían íntegras un 30% y un 42% de las cápsidas A2065H y D3069E/T2188A, respectivamente. Estos resultados han sido reproducidos. En un próximo experimento se realizará una cuantificación más precisa de estas diferencias de estabilidad, incluyendo tiempos de incubación más cortos.



**Figura 24.** Determinación de la estabilidad térmica de cápsidas vacías A2065H y D3069E/T2188A. Las cápsidas se sometieron a calentamiento a 42°C durante 0, 8, 18 y 30 h y se centrifugaron en gradiente de sacarosa. Las fracciones (1-18) fueron analizadas mediante Western Blot utilizando el MAb SD6. Se indican las posiciones aproximadas en el gradiente para los pentámeros y las cápsidas vacías. **(a)** Cápsidas vacías parentales (wt); **(b)** cápsidas vacías A2065H; **(c)** cápsidas vacías D3069E/T2188A. MP es un control negativo, que contiene marcadores de peso molecular preteñidos (bandas azules).



**Figura 25.** Estabilidad térmica a 42°C de cápsidas vacías modificadas A2065H y D3069E/T2188A comparada con la cápsida vacía parental. Los datos se obtuvieron a partir de los resultados del experimento de la Fig. 24. Los valores para cada cápsida variante y tiempo de incubación se expresan como porcentaje de cápsidas remanentes (no desensambladas a subunidades pentaméricas), tomando como valor de referencia del 100% la sumatoria de la cantidad de cápsidas íntegras y de pentámeros formados. Código de colores: Cápsida vacía parental (violeta); cápsida vacía variante A2065H (azul); cápsida vacía variante D3069E/T2188A (verde).

En resumen, los resultados de esta tercera parte de nuestro trabajo han permitido obtener buenas preparaciones de cápsidas vacías de VFA purificadas (o parcialmente purificadas), aunque todavía en cantidades muy limitadas. Los resultados demuestran que las mutaciones A2065H y D3069E/T2188A aumentan sustancialmente la estabilidad térmica de las cápsidas vacías, en proporción comparable al aumento de estabilidad que las mismas mutaciones producen sobre el virión infectivo. Estos resultados son importantes para el desarrollo de estrategias vacunales basadas en cápsidas vacías (ver Discusión).

#### 4.4. Investigación de las bases moleculares de la compensación del efecto letal de una mutación en la interfase entre pentámeros mediante una mutación compensatoria en una posición “*hot spot*” en la cápsida de VFA

Resultados previos de nuestro laboratorio demostraron que los efectos deletéreos de muchas mutaciones intrínsecamente letales introducidas en las interfases entre pentámeros

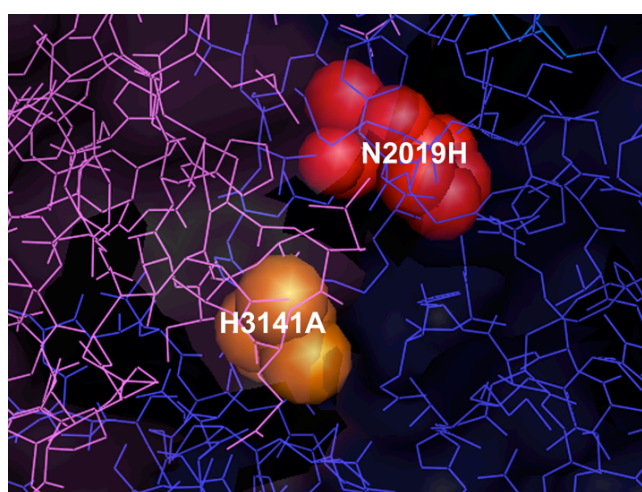
en el virión de VFA no conducen a la extinción del virus mutante. Con una frecuencia extremadamente elevada, el efecto deletéreo de esas mutaciones era compensado mediante la fijación de otras mutaciones en la cápsida, resultando en dobles (o múltiples) mutantes con una infectividad comparable a la del virus no mutado (Luna *et al.*, 2009; Luna, 2010). Los dos “*hot spots*” en la cápsida donde se fijaron más frecuentemente mutaciones compensatorias fueron las posiciones 2188 y 2019. Por ejemplo, fue precisamente una mutación de T2188 la que restauró la infectividad perdida a causa de la mutación D3069E, y permitió obtener uno de los variantes termoestables analizados en este trabajo (D3069E/T2188A, numerales 4.1, 4.2 y 4.3). El efecto compensatorio de mutaciones en 2188 parece implicar un cambio conformacional en la cápsida, ya que 2188 no se encuentra vecina a las posiciones donde se introdujeron las mutaciones letales, ni tampoco forma parte de las interfases interpentaméricas. El otro “*hot spot*” más prevalente, la posición 2019, sí se encuentra en la interfase entre pentámeros, y en él se fijó repetidamente una misma mutación, N2019H, que compensó el efecto deletéreo de varias mutaciones primarias que afectaban a residuos situados alrededor de 2019 (Luna *et al.*, 2009; **Figura 26**).

La mayoría de las mutaciones deletéreas cuyo efecto deletéreo compensó N2019H (R2018A, R2060A, H2021A y H3141A) implicaban la pérdida de una carga positiva (por protómero) en la interfase entre pentámeros. Propusimos, por tanto, que el efecto compensatorio de N2019H podría ser debido a la restauración local de la carga positiva perdida debido a la mutación primaria (Luna *et al.*, 2009). Más concretamente, propusimos que el efecto deletéreo de las mutaciones primarias podría deberse a una alteración en la estabilidad de la cápsida debida a la variación en las interacciones iónicas entre pentámeros. La restauración de la carga local a través de la mutación compensatoria restauraría la estabilidad parental.

La puesta a punto en la tercera parte de este trabajo (numeral 4.3) de un sistema adecuado de modificación genética, expresión, purificación y análisis de estabilidad de cápsidas vacías de VFA nos ha permitido explorar, por primera vez, efectos de mutaciones deletéreas en la cápsida de este virus sobre las propiedades físicas y químicas de la partícula vírica. En esta cuarta parte de nuestro trabajo, nos planteamos investigar experimentalmente el mecanismo molecular por el que la mutación N2019H compensa el efecto deletéreo de las mutaciones vecinas en las interfases entre pentámeros. Más



concretamente, hemos sometido a verificación nuestra hipótesis de que el efecto compensatorio de N2019H se debe a la restauración de la estabilidad de la cápsida parental a través de la restauración de la carga positiva perdida con la mutación primaria. Debido a la participación de la histidina en posición 3141 en la inestabilización del virión de VFA a pH ácido (Acharya *et al.*, 1989; Curry *et al.*, 1995; Ellard *et al.*, 1999), elegimos para probar esta hipótesis un sistema de estudio formado por las cápsidas H3141A (mutación primaria letal), N2019H (mutación secundaria compensatoria) y H3141A/N2019H (doble mutación, viable) (**Figura 26**).

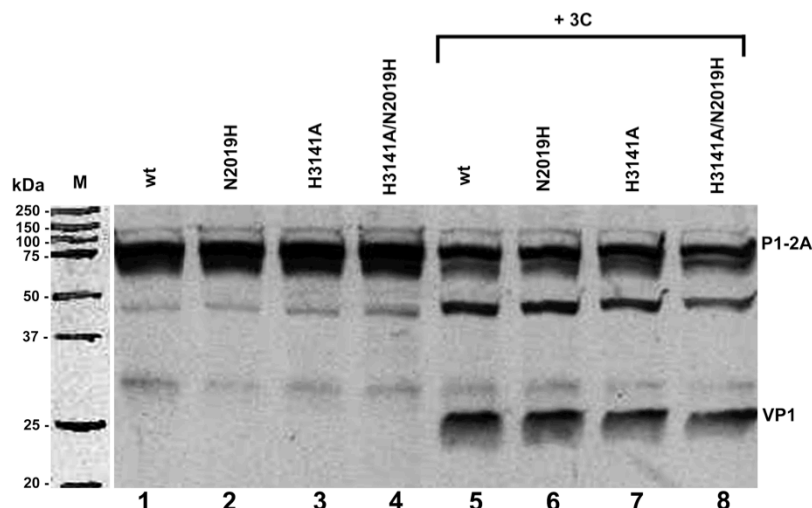


**Figura 26.** Localización de sustituciones de aminoácido en la cápsida de VFA H3141A/N2019H. Se representan en modelo de varillas partes de dos subunidades pentaméricas vecinas (en azul y magenta, respectivamente) en la estructura de la cápsida de C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994). Se indican en modelo de van de Waals y diferentes colores los residuos sustituidos en el mutante doble H3141A/N2019H, viable, que contiene la mutación primaria letal H3141A y la mutación secundaria compensatoria N2019H (ver texto).

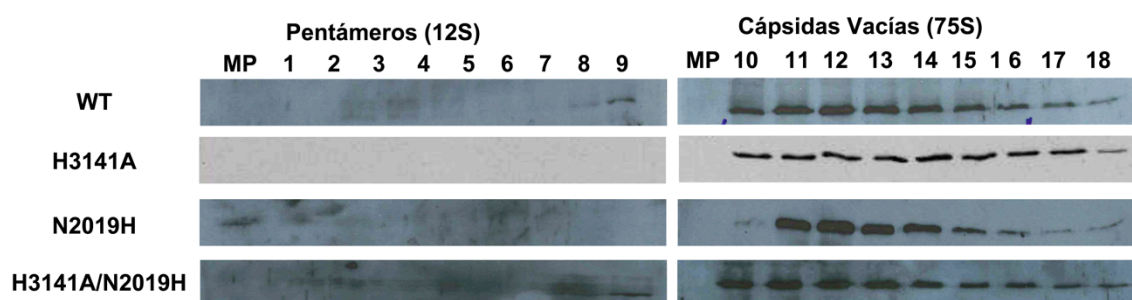
#### 4.4.1. Análisis de los efectos de las mutaciones H3141A, N2019H y H3141A/N2019H sobre el ensamblaje y estabilidad frente a disociación de la cápsida vacía de VFA

La mutación primaria H3141A, la mutación secundaria N2019H y las dos mutaciones H3141A/N2019H conjuntamente se introdujeron en el plásmido PL1-1, se expresaron cápsidas vacías mediante el sistema de expresión basado en virus vaccinia recombinante, y se verificó para cada mutante la expresión y procesamiento proteolítico de P1-2A por 3C, utilizando como control positivo el parental, expresado y analizado en

paralelo (**Figura 27**). Las tres P1-2A mutantes fueron procesadas por 3C en niveles similares a los obtenidos para P1-2A no mutada. En ausencia de 3C no se observó procesamiento en ninguno de los casos.



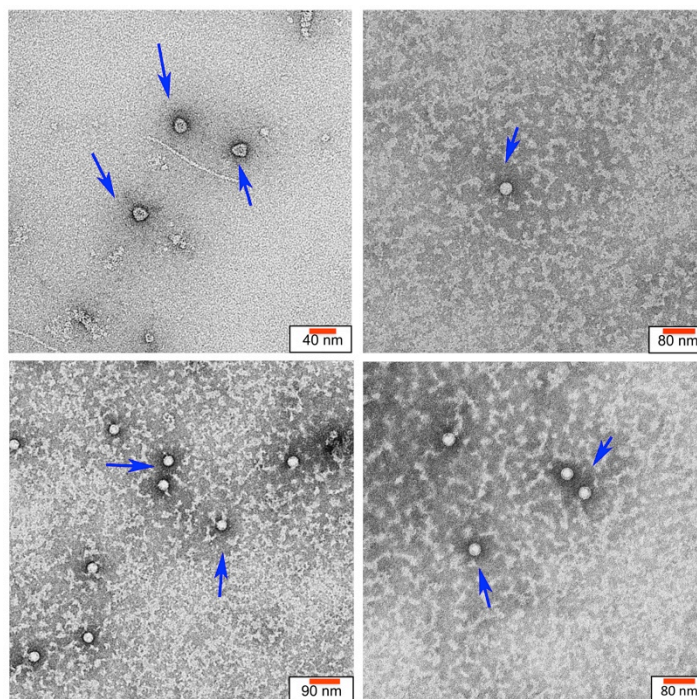
**Figura 27. Procesamiento por 3C de P1-2A parental, H3141A, N2019H y H3141A/N2019H.** Los extractos celulares fueron analizados por Western Blot utilizando el anticuerpo SD6. Células BHK-21c2 infectadas con vT7f3 fueron transformadas con PL1-1 wt (pocillos 1 y 5); PL1-1 H3141A (pocillos 2 y 6); PL1-1 N2019H (pocillos 3 y 7) y PL1-1 H3141A/N2019H (pocillos 4 y 8) en ausencia de la 3C o co-transfectadas con 3C (+3C). M son marcadores de peso molecular preteñidos. Se indican los pesos moleculares de los marcadores en kDa y las posiciones correspondientes a P1-2A y VP1.



**Figura 28. Análisis de la purificación de cápsidas vacías parental y mutantes H3141A, N2019H y H3141A/N2019H.** Las fracciones (1-18) procedentes de centrifugación de preparaciones de cápsidas vacías se analizaron mediante electroforesis y Western Blot utilizando el MAb SD6. Se indican las posiciones aproximadas en el gradiente para los pentámeros y las cápsidas vacías. MP es un control negativo, que contiene marcadores de peso molecular preteñidos (bandas azules).

Las cápsidas expresadas, parental y mutantes, se purificaron parcialmente en paralelo mediante el procedimiento a. El análisis de las fracciones mediante electroforesis y Western Blot, utilizando el MAb SD6, mostró en todos los casos la presencia de cápsidas

(coeficiente de sedimentación 75S) y ausencia de pentámeros (**Figura 28**). Las fracciones que contenían las cápsidas vacías fueron mezcladas y dializadas extensivamente. La visualización mediante microscopía electrónica (**Figura 29**), reveló para el parental y los tres mutantes estructuras esféricas entre 25-30 nm que corresponden a cápsidas de VFA.



**Figura 29.** Visualización por microscopía electrónica de preparaciones parcialmente purificadas de cápsidas vacías parental y mutantes H3141A, N2019H y H3141A/N2019H. (a) cápsidas vacías parentales; (b) H3141A (c) N2019H; (d) H3141A/N2019H. Para todos los paneles en flechas de color azul señalan algunas cápsidas vacías de VFA (diámetro estimado 25-30 nm). Las barras en el ángulo inferior derecho de cada imagen indican la escala correspondiente (diferente en cada imagen).

A pesar de que el nivel de expresión de P1-2A fue esencialmente el mismo para el parental y los tres mutantes, se observó de forma consistente en varias preparaciones, tanto mediante Western Blot como por microscopía electrónica, una menor cantidad de cápsidas para H3141A que para el parental y los mutantes N2019H y H3141A/N2019H. En una primera estimación, la cantidad de cápsidas H3141A no superó el 30% de la cantidad de cápsidas parentales obtenidas en paralelo. Para obtener una suficiente cantidad de cápsidas H3141A hubo que realizar una preparación a mayor escala de H3141A (aproximadamente el doble que de parental), a pesar de lo cual se obtuvieron sólo la mitad de cápsidas H3141A que de cápsidas parentales. Estos resultados indican que la sustitución H3141A



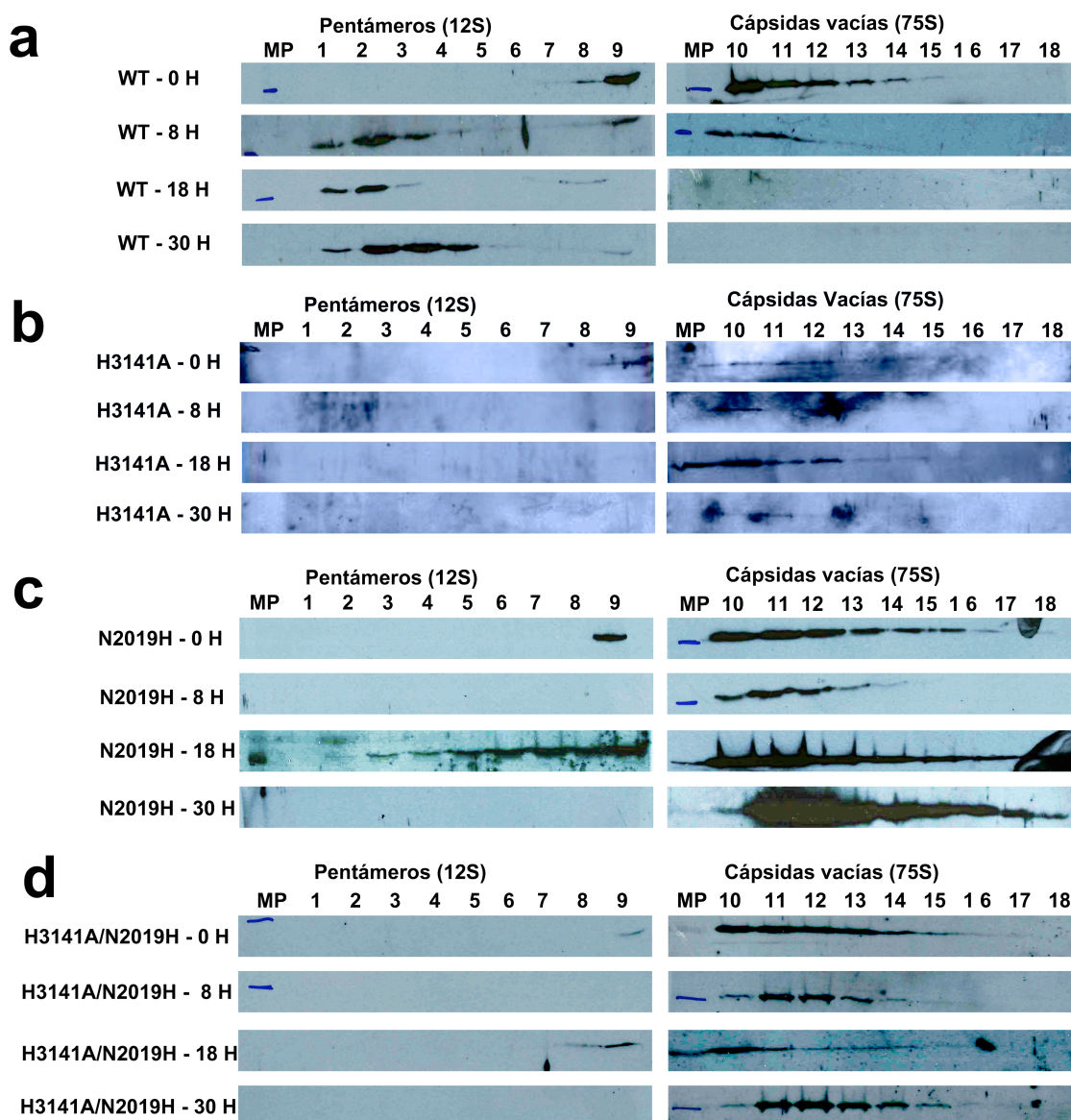
interfiere con el ensamblaje, y que la mutación N2019H es capaz de compensar este efecto, permitiendo un ensamblaje normal.

A continuación se analizó la estabilidad térmica de las cápsidas vacías variantes H3141A, N2019H y H3141A/N2019H. Alícuotas de las preparaciones de cápsidas mutantes, y de las cápsidas parentales preparadas analizadas en paralelo, se incubaron a 42°C durante 8, 18, 30 h y se determinó la cantidad de cápsidas intactas remanentes y de pentámeros formados, del mismo modo que se ha descrito en el numeral 4.3.2 (**Figura 30**).

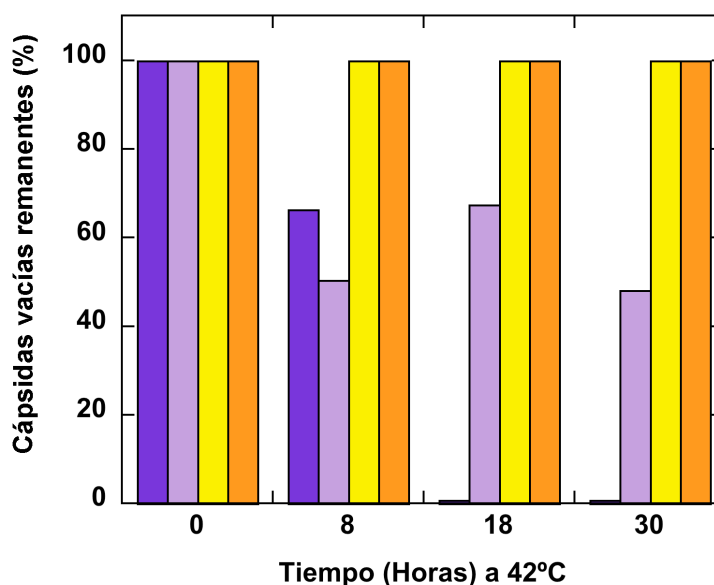
Los valores obtenidos a partir de los densitometrados de las bandas específicas en la **Figura 30** se normalizaron para dar el porcentaje de cápsidas vacías remanentes, tomando como valor de referencia (100%) la sumatoria de las cápsidas íntegras y las desensambladas a pentámeros en cada uno de los tiempos evaluados (**Figura 31**). Las cápsidas variantes H3141A fueron mucho más resistentes frente a su disociación en pentámeros que la cápsida parental. Tras 18 h de incubación en las condiciones de este experimento ya no quedaban cápsidas vacías parentales, mientras que aproximadamente el 50% de las cápsidas vacías H3141A aún no se habían disociado, ni tampoco a 30 h. Sorprendentemente, las cápsidas vacías N2019H y H3141A/N2019H no fueron menos estables, sino incluso más estables que H3141A, de modo que el 100% de las cápsidas N2019H y H3141A/N2019H se mantuvieron íntegras incluso tras 30 h de incubación a 42°C. Los resultados mostrados en la **Figura 31** son preliminares. Los experimentos correspondientes están siendo repetidos, con objeto de confirmar este punto y determinar de modo más preciso las diferencias de estabilidad.

En resumen, los resultados obtenidos en esta cuarta parte de nuestro trabajo indican que la mutación letal H3141A en VFA interfiere con el correcto ensamblaje de la cápsida, y además estabiliza (a pH neutro) la cápsida una vez formada, con respecto a la cápsida parental. La mutación compensatoria N2019H por sí sola no afecta al ensamblaje, pero estabiliza aún más que H3141A la cápsida vacía. La combinación de mutaciones H3141A/N2019H restaura el ensamblaje normal de la cápsida vacía, y mantiene la muy elevada estabilidad conferida principalmente por la mutación N2019H. Por tanto, parece que el efecto letal de la mutación H3141A se debe, al menos en parte, a un defecto de ensamblaje, y que la mutación compensatoria N2019H elimina este defecto. De forma inesperada, este estudio nos ha llevado a producir cápsidas vacías de VFA modificadas (N2019H y H3141A/N2019H) que, si los resultados preliminares obtenidos a este respecto

se confirman, resultan ser extraordinariamente estables frente a la disociación térmica, y engrosan la notable colección de viriones y cápsidas termoestables de posible aplicación vacunal que hemos obtenido en este trabajo.



**Figura 30.** Determinación de la estabilidad térmica de cápsidas vacías H3141A, N2019H y H3141A/N2019H. Las cápsidas se sometieron a calentamiento a 42°C durante 0, 8, 18 y 30 h y se centrifugaron en gradiente de sacarosa. Las fracciones fueron analizadas mediante Western Blot utilizando el MAb SD6. Se indican las posiciones aproximadas en el gradiente para los pentámeros y las cápsidas vacías. (a) Cápsidas vacías parentales (wt); (b) H3141A; (c) N2019H; (d) H3141A/N2019H. MP es un control negativo, que contiene marcadores de peso molecular preteñidos (bandas azules).



**Figura 31.** Estabilidad térmica a 42°C de cápsidas vacías modificadas H3141A, N2019H y H3141A/N2019H. Los datos se obtuvieron a partir de los resultados del experimento de la Fig. 30. Los valores para cada cápsida variante y tiempo de incubación se expresan como porcentaje de cápsidas vacías remanentes (cápsidas no desensambladas a subunidades pentaméricas), tomando como valor de referencia del 100% la sumatoria de la cantidad de cápsidas íntegras y de pentámeros formados. Código de colores: Cápsida vacía parental (azul); cápsida vacía H3141A (violeta); cápsida vacía N2019H (amarillo); cápsida vacía H3141A/N2019H (naranja).

#### 4.4.2. Análisis de la estabilidad de VFA mutantes frente a la disociación a pH ácido

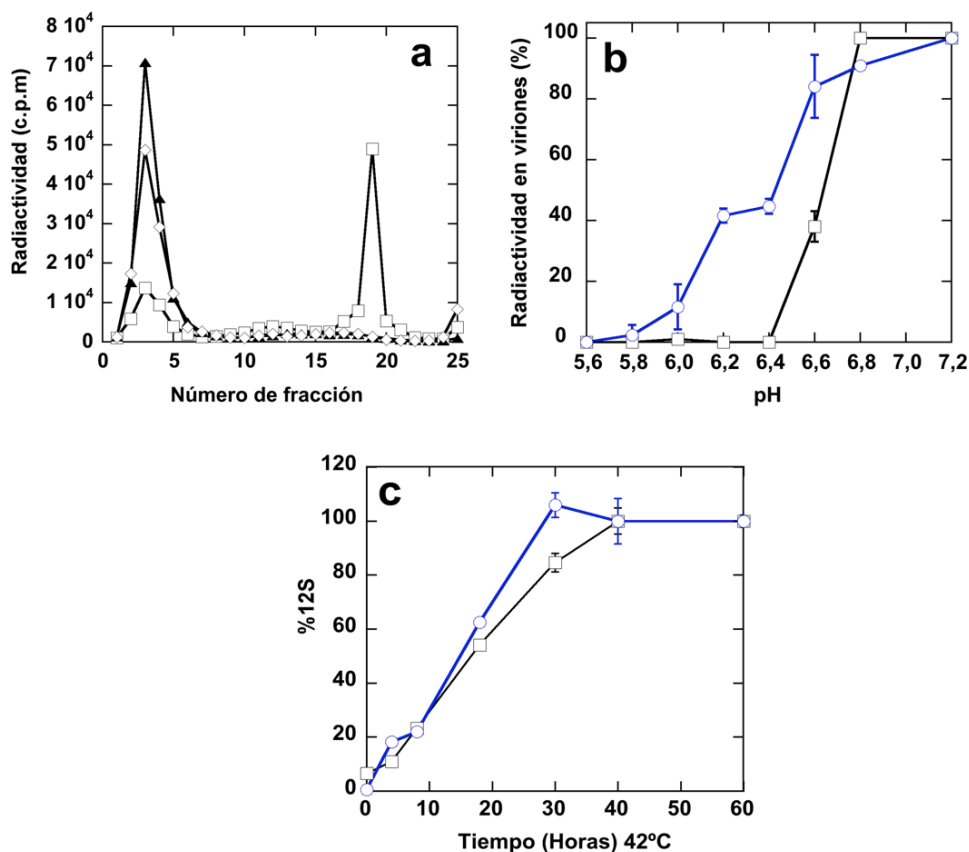
Estamos planteando actualmente el estudio de la estabilidad de las cápsidas vacías H3141A, N2019H y H3141A/N2019H a pH ácido, con objeto de profundizar más en el mecanismo de compensación de N2019H. En concreto, pretendemos explorar si N2019H podría facilitar la desencapsidación de VFA a pH ácido, que datos anteriores sugieren podría ser inhibida por H3141A. Desde esta perspectiva, cabe mencionar aquí algunos resultados relativos a los efectos de diversas mutaciones en la cápsida de VFA sobre la estabilidad frente a la disociación de virus mutantes obtenidos por el grupo del Prof. F. Sobrino (CBMSO) que presentan una sensibilidad alterada frente a la inactivación de la infectividad a pH ácido.

En primer lugar, el grupo del Prof. Sobrino aisló de poblaciones de VFA C-S8c1, mediante selección en presencia de  $\text{NH}_4\text{Cl}$  o concanamicina A (inhibidores de la acidificación endosomal), mutantes que presentan una menor resistencia que el parental

frente a la inactivación a pH ácido (Martín-Acebes *et al.*, 2010). Estos mutantes incluyen N1047D/A3118V y A3118V, que rindieron títulos similares al del parental a pH neutro ( $1 \times 10^7$  PFU/ml). Nosotros analizamos la estabilidad frente a la disociación de estos mutantes. Al igual que para T2023C/A3145C (numeral 4.1.1), encontramos que estos dos mutantes se disociaron rápidamente en pentámeros después de su purificación en gradiente de sacarosa seguida de diálisis (**Figura 32a**), a pesar de que el pH se mantuvo neutral durante todo el proceso. Estos resultados fueron reproducidos en experimentos independientes.

En segundo lugar, el grupo del Prof. Sobrino aisló a partir de poblaciones de VFA C-S8c1, mediante selección a pH ácido, mutantes que presentan una mayor resistencia que el parental frente a la inactivación a pH ácido (Martín-Acebes *et al.*, 2011). La mutación responsable del fenotipo de resistencia a pH ácido resultó ser N1017D. Este es un cambio isostérico que implica la introducción de una carga negativa adicional (por protómero) a menos de 10 Å de la interfase interpentamérica y a 8 Å de H3141. En colaboración con el grupo del Prof. Sobrino, nosotros analizamos la estabilidad del virión variante N1017D frente a la disociación a diferentes pHs. Viriones parental y N1017D se marcaron radiactivamente y purificaron, y posteriormente se incubaron a diferentes pHs para determinar a cada pH su resistencia relativa a la disociación en pentámeros. Los resultados (**Figura 32b**) mostraron que el virión N1017D es substancialmente más resistente que el parental frente a la disociación en pentámeros a pH ácido. Estos resultados fueron reproducidos en experimentos independientes. Además, analizamos la estabilidad térmica a 42°C de los viriones N1017D frente a la disociación a pentámeros mediante el ensayo de ELISA en *sandwich*. Los resultados (**Figura 32c**) revelaron que N1017D presenta una estabilidad térmica similar a la del virión parental.

En la Discusión presentaremos de modo conjunto posibles interpretaciones que contemplan para VFA la repulsión entre pentámeros *específicamente a pH ácido* (relacionada con la desencapsidación), la repulsión adicional que ocurre entre pentámeros *incluso a pH neutro* (descubierta en este trabajo), y los efectos estabilizantes frente a la temperatura o al pH ácido de las diversas mutaciones analizadas en este trabajo.



**Figura 32.** Estabilidad de VFA mutantes frente a la disociación a pH ácido. (a) Análisis mediante sedimentación en gradiente de sacarosa a pH neutro de preparaciones de viriones purificados y dializados parental (cuadrados blancos), N1047D/A3118V (diamantes) y A3118V (triángulos). El pico de la derecha corresponde a viriones intactos (coeficiente de sedimentación 140S) y el pico de la izquierda corresponde a subunidades pentaméricas (12S) producto de la disociación de los viriones. (b) Análisis mediante marcaje radioactivo y centrifugación de la estabilidad frente a la disociación a pH ácido de viriones parental (cuadrados, línea negra) y mutante N1017D (círculos, línea azul). Se representa el % de viriones remanentes tras incubación a diferentes pH, tomando como 100% la cantidad de viriones intactos a pH 7,2. Los valores promedio y las barras de error corresponden a dos mediciones independientes. (c) Análisis mediante ELISA de la cinética de disociación a pentámeros a pH neutro para viriones parental (cuadrados, línea negra) y N1017D (círculos, línea azul). El valor de absorbancia correspondiente a 100% de disociación de determinó mediante la incubación del virión parental durante 60 h a 42°C. Los valores promedio y barras de error corresponden a cuatro réplicas para cada tratamiento de un experimento representativo.

#### 4.5. Análisis de la importancia funcional de los residuos localizados en las interfases entre subunidades protoméricas de la cápsida de VFA

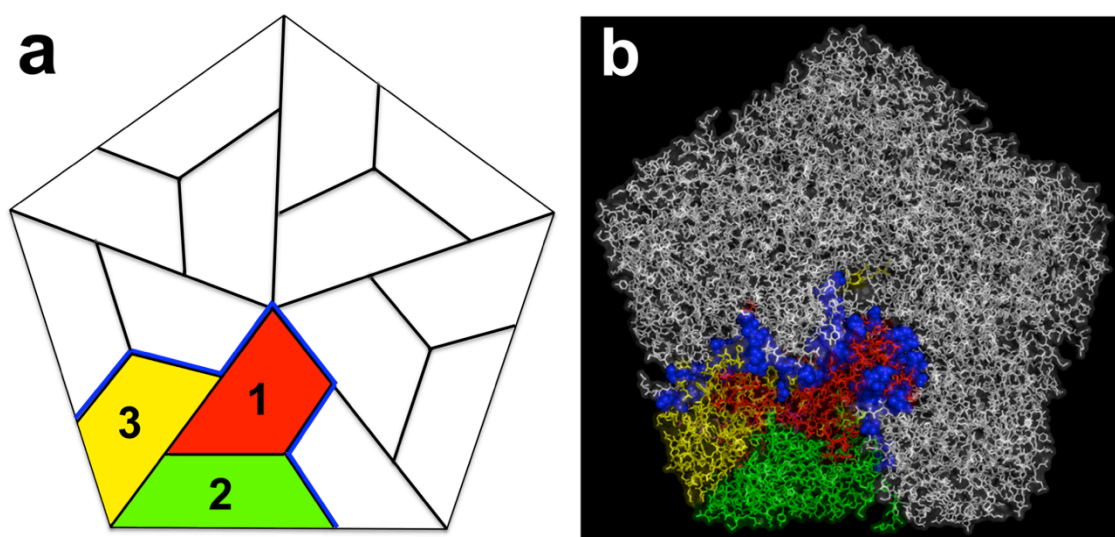
Estudios anteriores de nuestro laboratorio sobre los determinantes moleculares del ensamblaje y estabilidad de VFA, así como las cuatro partes de nuestro trabajo descritas en

los numerales 4.1 a 4.4, se centraron en las interfases interpentaméricas en la cápsida del virus. Sin embargo, el ensamblaje y la estabilidad de VFA pueden ser afectados por mutaciones localizadas en otras regiones de la cápsida, incluyendo las interfases entre los 5 protómeros que forman cada pentámero, durante la primera parte del proceso de morfogénesis viral (numeral 1.3.2). Para continuar con nuestros estudios sobre el ensamblaje de este virus, en la quinta parte de este trabajo nos propusimos realizar una disección molecular de las interfases entre los protómeros que forman los pentámeros.

#### **4.5.1. Análisis de la participación de la cadena lateral en las interfases entre subunidades protoméricas de la cápsida de VFA**

Para llevar a cabo este análisis, en primer lugar se identificaron en la estructura tridimensional de VFA C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994) los residuos que forman parte de la interfase entre protómeros vecinos dentro del mismo pentámero. Se utilizó el programa *Whatif*, y se definieron distancias límites de interacción entre grupos. Se encontró que cada interfase protómero-protómero está formada por un total de 93 residuos (**Figura 33**). De ellos, 41 tienen una cadena lateral polar y 52 una cadena lateral apolar, considerando a estos efectos la Tyr como cadena lateral esencialmente apolar (pese a la presencia del hidroxilo). Los residuos apolares se encuentran extendidos a lo largo de toda la interfase, formando un núcleo hidrofóbico alargado. De los 93 residuos interfásicos, únicamente 48 presentan sus cadenas laterales (a partir del C $\beta$ ) implicadas en interacciones interprotómero, y por tanto constituyen la parte de la interfase interprotomérica sensible al efecto de mutaciones *in vitro* o *in vivo* (exceptuando efectos indirectos debidos a cambios conformacionales), y asequible al análisis mutacional. De estas 48 cadenas laterales, 18 son esencialmente apolares y participan casi exclusivamente en interacciones de van der Waals, 2 cadenas laterales son tirosinas (esencialmente apolares, pero implicadas en interacciones por puente de hidrógeno mediante su grupo hidroxilo polar). Las 28 cadenas laterales restantes son esencialmente polares; de ellas, 10 participan exclusivamente en interacciones de van der Waals, y las 18 restantes participan además en un total de 16 puentes de hidrógeno, 3 puentes salinos y una interacción iónica a corta distancia.





**Figura 33. Estructura de un pentámero en VFA C-S8c1.** (a) esquema de la disposición de los 5 protómeros que forman el pentámero. Las líneas gruesas radiales en color azul delimitan uno de los 5 protómeros y corresponden a dos de las cinco interfases interprotoméricas idénticas en el pentámero. En el protómero así delimitado, se indican las posiciones de las proteínas de la cápsida VP1 (1, rojo), VP2 (2, verde) y VP3 (3, amarillo). La proteína VP4 es interna. (b) estructura atómica de un pentámero en el virión de C-S8c1 (Lea *et al.*, 1994), representada en modelo de varillas. En uno de los protómeros, las proteínas de la cápsida están coloreadas del mismo modo que en (a). Los 93 residuos de este protómero que participan en cada interfase entre protómeros se representan en modelo de van der Waals en color azul.

Para el análisis estructura-función por mutación sistemática a alanina, se eligieron todos los residuos para los que la cadena lateral participa en más de 2 contactos de van der Waals, incluyendo interacciones hidrofóbicas carbono-carbono (C-C), puentes de hidrógeno y/o interacciones iónicas atractivas. Basándose en estos criterios, 24 de los 48 residuos por protómero cuya cadena lateral está involucrada en cada interfase interprotomérica serían candidatos óptimos para mutagenizar a alanina. De estos, 3 pares de residuos (N1091-Y3169; K1085-E1175; K2217-E3138) están involucrados únicamente en interacciones entre el par, por lo que sería suficiente la eliminación de un único residuo de cada par para analizar el efecto de la interacción entre ellos. Por lo tanto decidimos mutar un residuo por cada uno de estos pares (Y3169; K1085 y K2217). Por otra parte, 2 de los 21 residuos (L1205 y V1206) fueron excluidos por cuestiones técnicas. A los 19 residuos por protómero cuyas cadenas laterales, conjuntamente, están implicadas en casi todas las interacciones no covalentes presumiblemente más fuertes entre protómeros, sumamos los residuos M3130 y V3215, como representantes de aquellos residuos interfásicos cuyas cadenas laterales están implicadas en interacciones presumiblemente muy débiles (1 o 2 contactos de van der Waals) entre protómeros.

En resumen, se eligieron para el análisis un total de 21 residuos (**Tabla 11** y **Figura 34**). Las cadenas laterales de 19 de ellos están implicadas en casi todas las interacciones no covalentes presumiblemente más fuertes entre protómeros. De estas 19 cadenas laterales 6 son fundamentalmente apolares y 13 polares. Cinco de las cadenas laterales participan fundamentalmente en contactos apolares, con una media de 7 contactos de van der Waals por cadena lateral. Las 13 cadenas laterales fundamentalmente polares y Y3169 participan conjuntamente en un total de 13 puentes de hidrógeno cadena lateral-cadena lateral o cadena lateral-cadena principal (distancia límite 3,5 Å), 2 puentes salinos estrictos (distancia límite 3,5 Å) y una interacción iónica a corta distancia (3,8 Å), además de algunas interacciones de van der Waals (**Tabla 11**).

Las 21 mutaciones elegidas se introdujeron en el clon infeccioso de VFA C-S8c1 (numeral 3.7.2). A continuación, se obtuvieron los correspondientes ARN víricos mutantes, y el parental como control en paralelo, mediante transcripción *in vitro* de los clones infecciosos (numeral 3.8.1).

#### **4.5.2. Evaluación del efecto sobre la infectividad de VFA causado por el truncamiento de la cadena lateral de residuos implicados en interacciones interprotoméricas**

Para evaluar el efecto sobre la infectividad de VFA de las mutaciones individuales introducidas en las interfases interprotómero en la cápsida, se transformaron células BHK-21c2 con cantidades equivalentes de ARN infeccioso, incluyendo en cada experimento el ARN derivado del clon infeccioso parental como control interno. La progenie vírica obtenida en cada caso a diferentes h.p.e. se cuantificó mediante titulación de la infectividad (**Tabla 12**). La relación de infectividad se expresó como el cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control parental no mutado en el mismo experimento. Consideramos una reducción significativa de la infectividad una disminución de al menos un orden de magnitud. De acuerdo con sus efectos sobre la infectividad, clasificamos a los 21 residuos mutagenizados en cuatro grupos (**Tabla 12** y **Figura 34**):



**-Grupo I :** mutantes que no generaron progenie viral detectable en ninguno de los tiempos evaluados. Se incluyó el 19 % de los mutantes analizados (R2167A, K2217A, Q3100A y Y3169A).

**-Grupo II :** mutantes que presentaron una reducción significativa en la infectividad para la progenie recogida a cualquier tiempo post-electroporación. Incluyó el 5% de los mutantes analizados (únicamente Y2100A). Este mutante presentó un tamaño de placa claramente menor que el del parental a todos los tiempos post-electroporación.

**-Grupo III :** mutantes que presentaron una reducción significativa en el título de la progenie recogida a las 45 h.p.e., pero que a tiempos más largos (55 o 72 h.p.e. alcanzaron títulos similares al del parental a los mismos tiempos. Incluyó el 19 % de los mutantes analizados (K1085A, L2051A; M3014A y N2047A). Tres de estos 4 mutantes presentaron un tamaño de placa claramente menor que el del parental a todos los tiempos post-electroporación. La reversión requería más de un cambio de nucleótido, por lo que es muy improbable que haya ocurrido en las rondas de replicación adicionales ocurridas entre 45 h.p.e. y 72 h.p.e. Los mutantes fueron secuenciados, confirmando la presencia de estas mutaciones y la ausencia de mutaciones acompañantes. Es probable que el efecto de estas mutaciones sea ralentizar en cierta medida la cinética de producción de virus, lo que es consistente con el menor tamaño de placa obtenido.

**-Grupo IV:** mutantes que presentaron títulos virales similares al parental. Constituido por la mayoría de los mutantes analizados (doce mutantes, 57% del total; ver [Tabla 12](#)). Todos estos mutantes presentaron un tamaño de placa grande, comparable al del parental.

Si el efecto que presentan el 43% de estas mutaciones interfásicas sobre la infectividad (grupos I, II, III; [Tabla 12](#)) se debe a la pérdida de energía de interacción entre protómeros, era de esperar una correlación entre el grupo en que clasificamos el mutante (I a IV) y la fuerza esperable para la interacción de cada residuo con otros residuos en el protómero vecino. La comparación entre las interacciones interprotómero de la cadena lateral y efecto sobre la infectividad se detalla grupo por grupo (ver [Tabla 11](#)):

**-Grupo I (no infectivos):** Y3169 participa en un puente de hidrógeno y 5 contactos de van der Waals, Q3100 en un puente de hidrógeno, R2167 en un puente salino y K2217 en una interacción culombiana sin formar un puente salino estricto.

**-Grupo II** (infectividad reducida): Y2100 participa en un gran número (10) de contactos de van der Waals, muchos de ellos contactos C-C, y se encuentra esencialmente enterrado en la cápsida.

**-Grupo III** (infectividad retrasada, pero normal a tiempos largos): K1085 forma un puente salino, N2047 dos puentes de hidrógeno; L2051 y M3014 participan en 3-4 contactos de van der Waals cada uno y se encuentran enterrados en la cápsida.

**-Grupo IV** (infectividad normal): Este grupo incluyó desde residuos con cadenas laterales sin apenas contactos entre protómeros, hasta otros con cadenas laterales que participan en un gran número de contactos de van der Waals (8) incluyendo muchos contactos C-C (Y1107), o están implicados en uno, o incluso dos, puentes de hidrógeno; asimismo, incluye tanto residuos enterrados como residuos expuestos al solvente. Por tanto, no se observa una clara correlación entre efecto sobre la infectividad y energía esperable de interacción.

En resumen, la mayoría (cerca del 60%) de los residuos en las interfases entre protómeros dentro de un mismo pentámero que han sido analizados no presentan, al menos individualmente, un papel relevante en la producción de progenie vírica. Además, del 40% restante, la mitad presenta un efecto pequeño sobre la infectividad (esencialmente, un cierto retraso en la producción), y únicamente un 20% de los residuos totales analizados es crítico para la infectividad. Estos resultados son notables, especialmente porque casi todos los residuos analizados están implicados en las interacciones presumiblemente más fuertes entre protómeros; y, además, porque esta descripción funcional de la interfase entre protómeros resulta enteramente diferente de la descripción funcional de la interfase entre pentámeros en el mismo virus, en la que la gran mayoría de residuos, incluyendo los que apenas establecen unos pocos contactos débiles entre pentámeros, son críticos para la infectividad (Mateo *et al.*, 2003). Finalmente, es de resaltar que no observamos ninguna correlación clara entre el tipo o la presumible fuerza de la interacción de cada residuo mutagenizado con el protómero vecino y los efectos de la eliminación de estas interacciones (por mutación a alanina) sobre la infectividad. Esta última observación sugiere, además, que la causa del efecto negativo sobre la infectividad del VFA de la mutación a alanina de unos pocos residuos en las interfases interprotoméricas no se debe a la pérdida de interacciones entre protómeros.

**Tabla 11.** Residuos en la cápsida de VFA C-S8c1 que participan en la mayor parte de las interacciones interprotómero presumiblemente más energéticas y que han sido analizados en este estudio.

Residuo	Puentes de hidrógeno <sup>a</sup>	Interacciones carga-carga <sup>a</sup>	Contactos van der Waals <sup>b</sup>	Cadena lateral expuesta <sup>c</sup>	Grupo según infectividad <sup>d</sup>
T1050	1mc (A1207)		9 (2)	Sí	IV
N1060	1sc (T1102)		2 (0)	Sí	IV
K1085		1sc ( E1175)	3 (0)	Sí	III
N1100	1mc (R3218)		4 (2)	Sí	IV
T1102	1sc (N1060)		12 (5)	Sí	IV
Y1107			9 (8)	No	IV
N2047	1sc (2xS3163)		13 (0)	No	III
S2049	1mc (2xY3161)		10 (0)	No	IV
L2051			5 (4)	No	III
Y2100			16 (10)	No	II
R2167		1sc (D3166)	3 (0)	No	I
K2217		1 sc (E3138, 3,85 Å)	4 (2)	Sí	I
N3013	1sc (T1113)		9 (2)	No	IV
M3014			6 (3)	No	III
T3016	3sc (T1101, N1103, 3xT1105)		11 (1)	Sí	IV
T3099	1sc (N1091)		9 (4)	No	IV
Q3100	1sc (T1120)		3 (0)	No	I
M3130			3 (1)	Sí	IV
I3143			5 (4)	No	IV
Y3169	1sc (N1091)		11 (5)	No	I
V3215			3 (2)	No	IV

<sup>a</sup> Para los puentes de hidrógeno y los puentes salinos la distancia límite fue de 3,5 Å. Para las interacciones carga-carga se indica la distancia entre cargas en caso de que sea superior a 3,5 Å; no se consideran interacciones carga-carga a una distancia superior a 5 Å; sc: cadena lateral; mc: cadena principal.

<sup>b</sup> La distancia límite impuesta para los contactos de van der Waals fue 0,5 Å superior a la suma de los radios de van der Waals de los átomos considerados. M3130 y V3215 sólo participan en unos pocos contactos de van der Waals, pero se incluyeron como representantes de los residuos interfásicos menos implicados en interacciones entre protómeros de un pentámero (ver texto).

<sup>c</sup> Se indica si la cadena lateral se encuentra expuesta y orientada hacia la superficie de la cápsida.

<sup>d</sup> Grupo en que se incluye el residuo en función del efecto de su mutación a alanina sobre la infectividad (ver texto).

**Tabla 12.** Efectos sobre la infectividad de VFA de la mutación a alanina de cada uno de los residuos en las interfases entre protómeros analizados en este estudio

Mutantes <sup>a</sup>	Nº cambio de nucleótidos <sup>b</sup>	Infectividad relativa <sup>c</sup>			Tamaño placa <sup>d</sup>	Fluorescencia % células positivas <sup>e</sup>	% conservación <sup>f</sup>
		45 h.p.e	55 h.p.e	72 h.p.e.			
wt	-	1	1	1	Grande	92	-
<u>Grupo I</u>							
R2167A	3	Letal	Letal	Letal	-	65	100
K2217A	2	Letal	Letal	-	-	0	100
Q3100A	3	Letal	Letal	Letal	-	0	80
Y3169A	3	Letal	Letal	Letal	-	10	100
<u>Grupo II</u>							
Y2100A	3	0,021	0,024	0,083	Pequeña	43	98
<u>Grupo III</u>							
K1085A	3	0,0100	0,128	2,500	Grande	75	40
N2047A	3	0,0024	0,009	0,240	Pequeña	0	100
L2051A	3	0,0003	0,007	0,250	Pequeña	84	100
M3014A	3	0,0016	0,016	0,700	Pequeña	65	28
<u>Grupo IV</u>							
T1050A	2	0,228	0,600	1,000	Grande	81	41
N1060A	3	6,309	7,692	7,700	Grande	86	9
N1100A	3	9,779	3,077	-	Grande	75	71
T1102A	2	0,154	0,340	0,400	Grande	67	46
Y1107A	3	0,379	0,577	1,150	Grande	41	73
S2049A	2	1,067	0,750	-	Grande	93	94
N3013A	3	0,946	1,769	-	Grande	90	28
T3016A	2	2,000	1,739	-	Grande	55	81
T3099A	2	0,268	4,103	1,300	Grande	90	89
M3130A	3	0,857	2,250	0,400	Grande	89	60
I3143A	3	0,763	1,731	6,000	Grande	58	99
V3215A	2	1,500	2,100	0,300	Grande	75	61

<sup>a</sup> Los residuos se han agrupado en función del efecto sobre la infectividad de su mutación a alanina: grupo I, mutantes no infecciosos; grupo II, mutantes de infectividad reducida; grupo III, mutantes de infectividad reducida que recuperan el título del parental a tiempos más largos; grupo IV, mutantes de infectividad similar a la del parental.

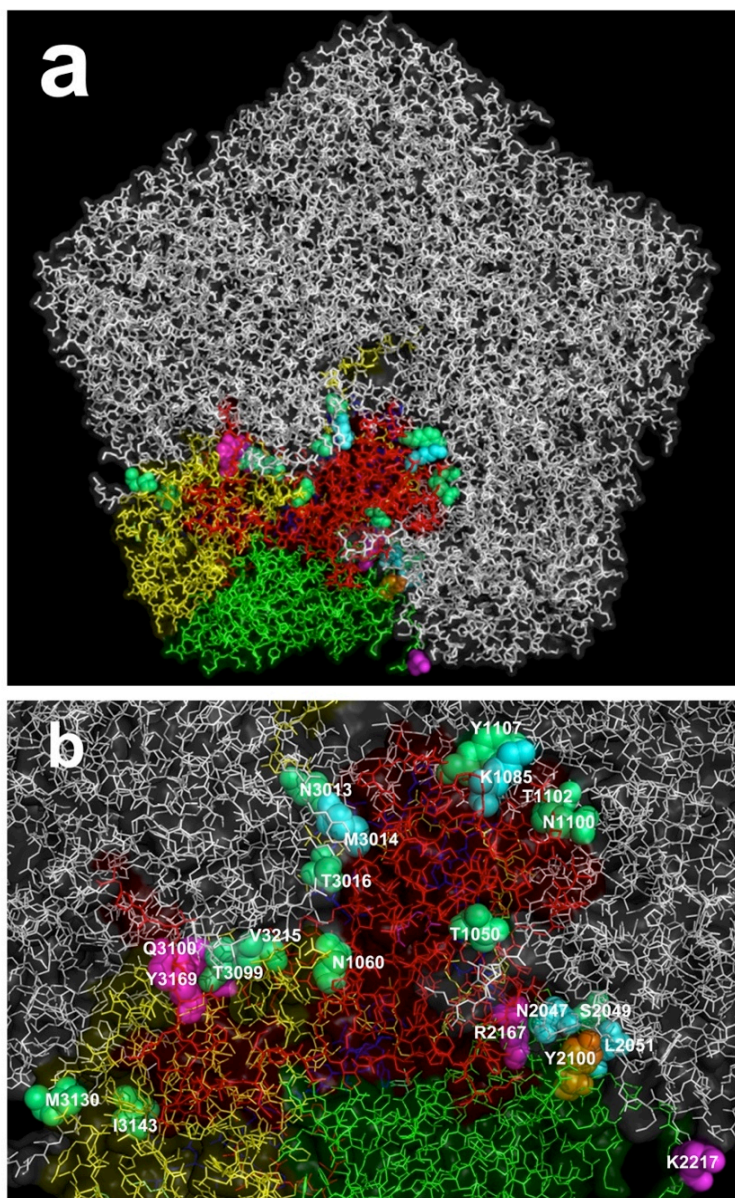
<sup>b</sup> Se indica el número de cambio de nucleótidos introducidos durante la mutagénesis dirigida.

<sup>c</sup> Infectividad relativa de la progenie recogida a 45, 55 o 72 h.p.e. La infectividad relativa se expresa como el cociente entre el título medio obtenido para un determinado mutante y el obtenido para el control parental no mutado en el mismo experimento.

<sup>d</sup> Se determinó el tamaño de placa de acuerdo a un criterio establecido previamente (Mateo *et al*, 2003). Placa grande: 3-5 mm; placa pequeña: 1-3 mm.

<sup>e</sup> Se indica el % de células que presentaron fluorescencia positiva con el MAb 5C4 con respecto a las células totales (teñidas con DAPI). Los valores para el virus parental corresponden al promedio de cuatro experimentos independientes cada uno por duplicado, mientras que para los mutantes corresponden al promedio de dos experimentos independientes cada uno por duplicado o triplicado.

<sup>f</sup> Se indica el % de conservación en un alineamiento de 250 secuencias de VFA en relación a C-S8c1.



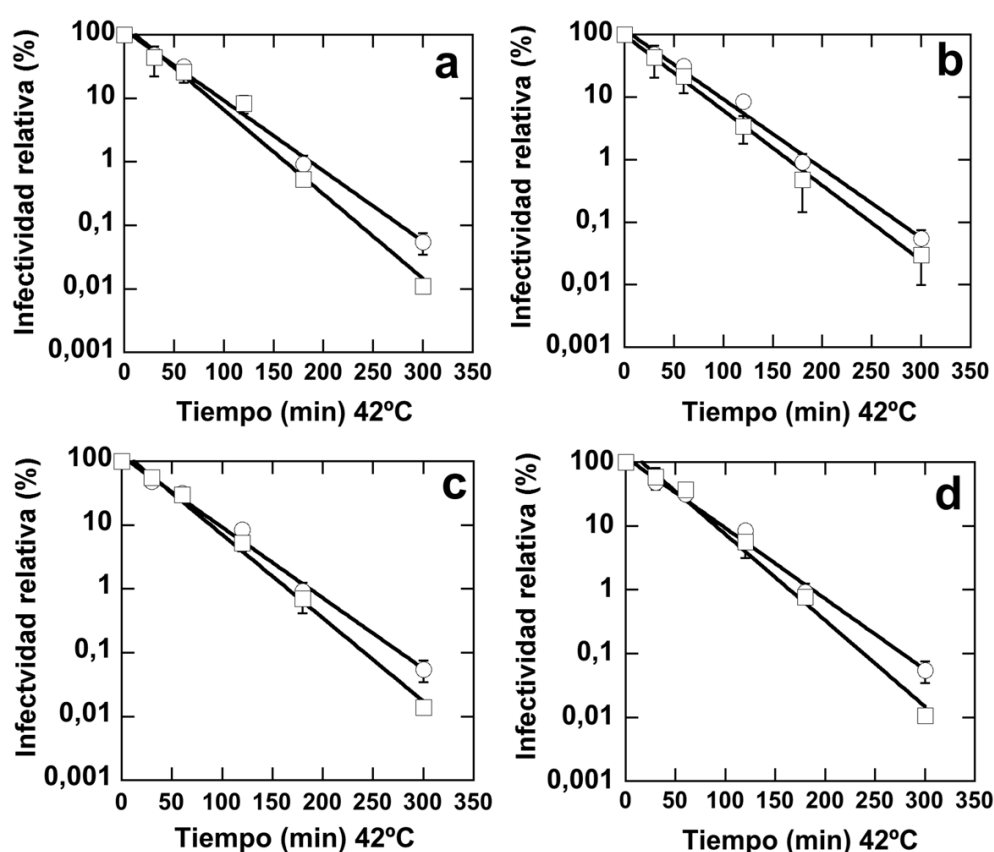
**Figura 34.** Localización en VFA de los residuos de un protómero que participan en el reconocimiento entre protómeros y que han sido analizados en este estudio. Estructura atómica de un pentámero en el virión de C-S8c1 (a) representado como en la Figura 33b, en donde se muestran los residuos (en modelo de van der Waals) que participan en la mayor parte de las interacciones interprotómero presumiblemente más energéticas. Los residuos se han clasificado de acuerdo al grupo en función del efecto de su mutación a alanina sobre la infectividad. En magenta (grupo I), en naranja (grupo II), en cian (grupo III) y en verde claro (grupo IV), ver descripción más detallada en la [Tabla 12](#). (b) Se muestra en mayor detalle la localización en la interfase de cada uno de los residuos anteriores, y se identifican por su número de posición.

#### 4.5.3. Efecto de la pérdida de interacciones críticas en la interfase interprotómero en la estabilidad del virión de VFA frente a su inactivación térmica

Una posibilidad para explicar el efecto negativo sobre la infectividad de las mutaciones L2051A, M3014A y K1085A y Y2100A (grupos II y III), es que los viriones producidos fueran más sensibles a inactivación térmica. Para analizar esta posibilidad, llevamos a cabo ensayos cinéticos de inactivación térmica a 42°C para estos 4 virus



mutantes, usando el virus parental como control interno en cada experimento (numeral 3.17.1) (**Figura 35**). A partir de las cinéticas se calcularon las constantes de velocidad de inactivación  $k$  a 42°C, en al menos dos experimentos independientes para cada mutante y el parental. El valor obtenido para el parental fue  $k_{wt}=0,027\pm0,004 \text{ min}^{-1}$ , y para los mutantes fueron  $k_{mut}= 0,033 \pm 0,07 \text{ min}^{-1}$  (K1085A);  $k_{mut}= 0,028\pm0,002 \text{ min}^{-1}$  (N2047A);  $k_{mut}= 0,031\pm0,002 \text{ min}^{-1}$  (Y2100A); y  $k_{mut}= 0,033\pm0,005 \text{ min}^{-1}$  (M3014A). Todas estas constantes de velocidad son estadísticamente indistinguibles, y demuestran que el efecto de estas mutaciones sobre la infectividad no se debe a una desestabilización de los viriones infectivos.



**Figura 35.** Cinéticas de inactivación a 42°C de la infectividad para los virus variantes K1085A (a); N2047A (b); Y2100A (c) y M3014A (d). El título viral aproximado inicial fue de  $2 \times 10^7$  -  $4 \times 10^7$  PFU/ml. En todos los casos se ensayaron en paralelo el mutante en cuestión (cuadrados) y el virus parental como control (círculos). Los datos fueron normalizados y se indican como porcentaje de la infectividad remanente respecto al tiempo 0. Los valores promedio y las barras de error corresponden a dos (para los mutantes) o tres (virus parental) experimentos independientes.

### 4.5.4. Papel de residuos en las interfases entre protómeros en etapas del ciclo viral previas al ensamblaje

Los resultados descritos en los numerales 4.5.2. y 4.5.3. sugieren que el efecto de las mutaciones letales, o que reducen la infectividad o retrasan la producción de progenie, no se debe a una pérdida de interacciones energéticamente importantes entre protómeros ni a la facilitación de la inactivación térmica del virión.

Para investigar si las mutaciones en las interfases entre protómeros ejercen su efecto en una etapa del ciclo vírico anterior a la interacción entre protómeros para formar pentámeros, realizamos ensayos de transfección de células BHK21c2 con cada uno de los ARN mutantes y el ARN parental como control, y analizamos en ensayos de inmunofluorescencia *in situ* si cada uno de los mutantes es capaz de llegar con normalidad al menos a la etapa de formación de protómeros no procesados. Para ello, se empleó el MAb 5C4, que no reconoce las proteínas de la cápsida de VFA aisladas, pero que sí reconoce un epítipo discontinuo presente tanto el protómero no procesado, como en el pentámero, como en la cápsida y el virión (Mateu *et al.*, 1994; Lea *et al.*, 1994; Saiz *et al.*, 1994). Una reducción significativa en la inmunofluorescencia de las células transfectadas indicaría que la mutación impide llegar a tener protómeros plegados.

Los ensayos de inmunofluorescencia *in situ* se llevaron a cabo para los 21 mutantes obtenidos (Tablas 11 y 12). Para cada mutante y el parental se calculó el porcentaje de las células que mostraron fluorescencia positiva debida a reactividad con el MAb 5C4. Los resultados obtenidos (Figura 36 y Tabla 12) se describen para cada grupo de mutantes.

**-Grupo IV** (infectividad normal): como se esperaba, 11 de 12 mutantes del grupo IV presentaron niveles normales de fluorescencia, con un porcentaje medio de células positivas de un 75%, comparable con el 91% obtenido para el parental. La fluorescencia de estos mutantes, como la del parental, presentó una distribución homogénea preferencial en el citoplasma (aunque en algunas células con algunos mutantes se observó cierto marcaje punteado concentrado en algunas regiones del citoplasma). La única excepción en este grupo fue Y1107A, que mostró una reducción significativa de la fluorescencia (41%) indicando una disminución en los niveles intracelulares de intermediarios de ensamblaje.

**-Grupo III** (infectividad retrasada pero normal a tiempos largos): los mutantes L2051A, M3014A y K1085A (grupo II) mostraron niveles normales de acumulación de protómeros. Únicamente el mutante N2047A no produjo fluorescencia detectable.

**-Grupo II** (infectividad reducida): el mutante Y2100A mostró una fluorescencia claramente reducida (43%).

**-Grupo I** (no infectivos): los mutantes K2217A, Q3100A y Y3169A no produjeron fluorescencia detectable, o sólo un 10% (Y3169A). R2167A fue el único de este grupo en presentar un nivel de fluorescencia (65%) no demasiado reducida.

Vamos a realizar a corto plazo ensayos de inmunofluorescencia *in situ* utilizando el anticuerpo específico para pentámeros VHH2 M3ggsVI-4<sub>Q6E</sub>, lo que nos permitirá averiguar si los muy pocos mutantes que forman protómeros pero presentan una infectividad reducida o retrasada, pero dan señal con 5C4, son capaces de formar pentámeros a partir de los protómeros formados.

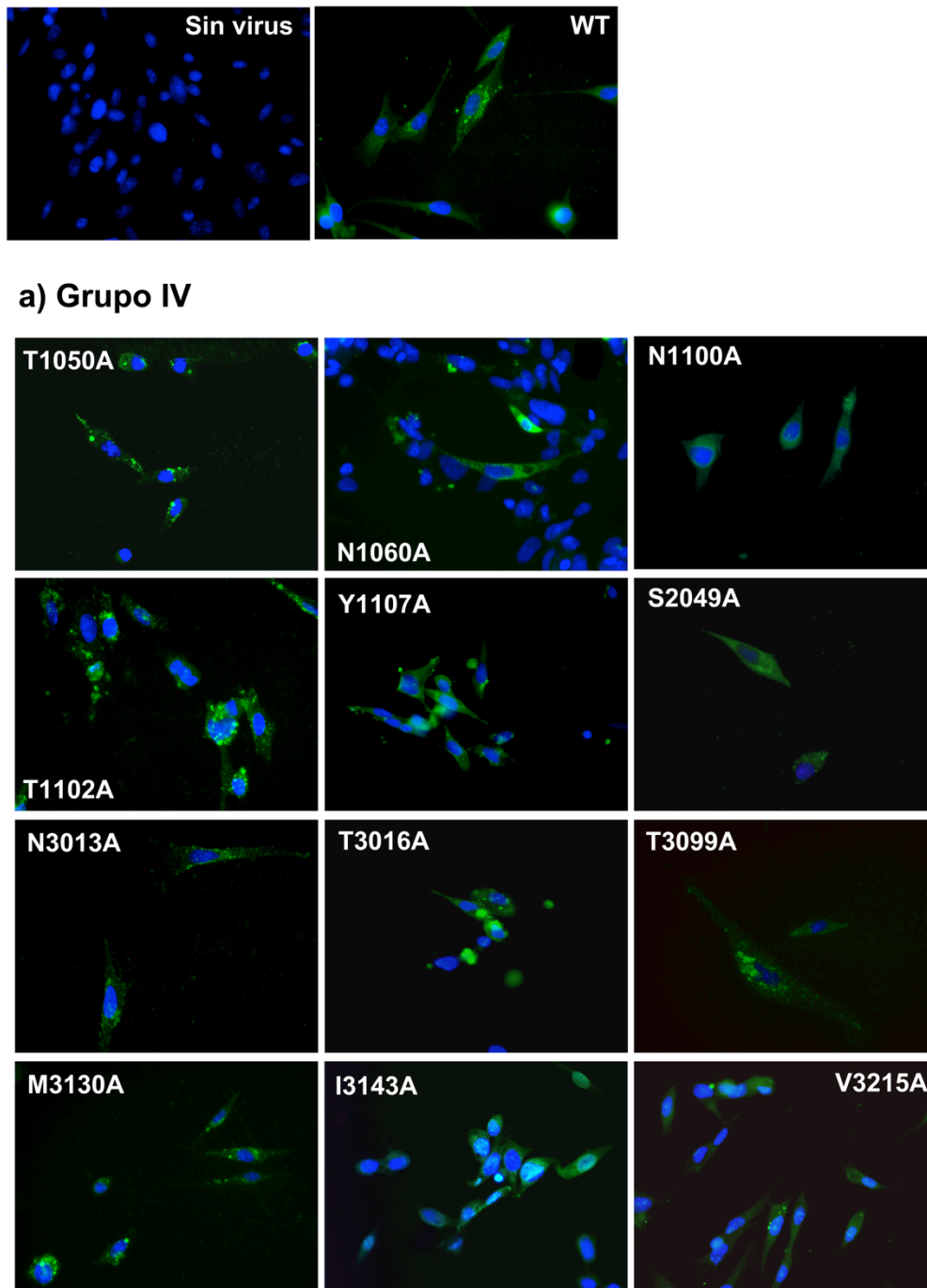
#### **4.5.5. Análisis de correlación entre la importancia funcional, la conservación evolutiva y la localización en la estructura del virión, para los residuos en las interfases entre protómeros.**

Para finalizar esta parte de nuestro estudio, analizamos la posible correlación entre la importancia funcional de los 21 residuos analizados en las interfases entre protómeros, su grado de conservación en VFA y su posición en la estructura del virión. Para ello empleamos un alineamiento de 244 secuencias para la proteína VP1 y 250 alineamientos de secuencia para las proteínas VP2 y VP3 de la cápsida pertenecientes a los siete serotipos de VFA. La secuencia de C-S8c1 de VFA (NC\_002554) fue comparada con las secuencias disponibles en el GenBank para los diferentes serotipos. Los datos se indican en la **Figura 37** y se resumen en la **Tabla 12**.

Los promedios de conservación de los residuos catalogados en los diferentes grupos fueron: 95% para los 4 residuos del grupo I (virus no infectivos); 97% para el residuo del grupo II (infectividad reducida); 67% para los 4 residuos del grupo III (infectividad retrasada); y 62% para los residuos del grupo I (infectividad normal). Por tanto, existe una

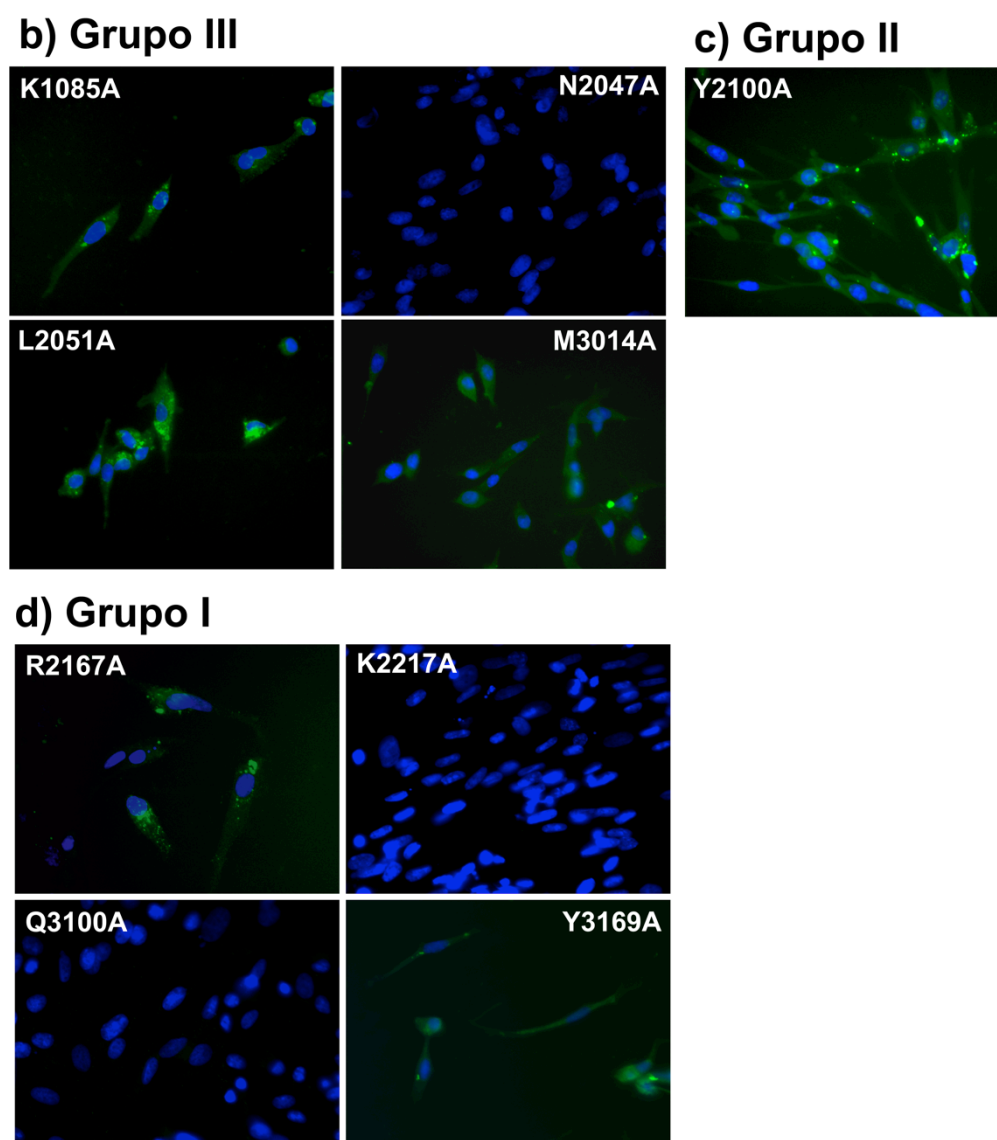


correlación entre el papel funcional de los residuos interprotoméricos analizados para la infectividad del virión y su grado de conservación.



**Figura 36.** Inmunofluorescencia *in situ* en células transfectadas con ARN de VFA que presentan mutaciones en las interfases entre protómeros. En esta página: (a) Mutantes del grupo IV; En la siguiente página: (b) mutantes del grupo III; (c) mutantes del grupo II; (d) mutantes del grupo I. En paralelo se llevó un control con células transfectadas sin ARN viral (*sin virus*) o con el ARN del virus parental (*wt*). Las células se fijaron a las 30 h.p.e. y se trataron con el MAb 5C4 (marcaje en verde). Las células se tiñeron además con DAPI (marcaje en azul). Para cada uno los mutantes se muestran imágenes representativas, en las cuales se combinaron las imágenes obtenidas en las dos longitudes de onda diferentes (numeral 3.15).

Continuación **Figura 36.**



**Figura 36 (continuación).** Inmunofluorescencia *in situ* en células transfectadas con ARN de VFA que presentan mutaciones en las interfases entre protómeros. Ver leyenda en página anterior.

En cuanto a su localización en la estructura de VFA (**Figura 38**), la mayoría de los residuos cuya mutación a alanina no afecta a la infectividad (grupo IV) se encuentran dispersos por la interfase entre dos protómeros vecinos. Por el contrario, la mayoría de los residuos cuya mutación a alanina afecta en alguna medida a la infectividad (grupos I, II y III) se encuentran relativamente agrupados (laxamente) en una región limitada de la interfase entre protómeros vecinos. Esta región se encuentra a la máxima distancia del epítipo reconocido por el MAb 5C4 usado para el análisis por inmunofluorescencia, de los

## Resultados

sitios antigénicos descritos para VFA, del sitio de reconocimiento por el receptor celular y de otras regiones funcionales identificadas en la cápsida. Estas observaciones y los resultados obtenidos indican que esta región de la cápsida de VFA tiene un papel funcional aún no descrito en alguna etapa del ciclo vírico.

Serotipo <sup>a</sup>	Residuo interprotómero <sup>b</sup>										
C-S8c1	T1050	N1060	K1085	N1100	T1102	Y1107	N2047	S2049	L2051	Y2100	R2167
C	T46	N23 G11 S9 X3	K46	N46	T28 S15 X2 A1	Y46	N34	S34	L34	Y34	R34
A	V42 X4	G46	N43 T3	N46	S38 G8	Y46	N57	S57	L57	Y57	R57
O	V40 A1	T41	N33 D6 W1 E1	N41	T41	Y41	N90	S90	L90	Y90	R90
Asia 1	T41 I2 V1	T44	D44	N42 IS IX	T44	Y44	N39	S39	L39	Y34 T4 N1	R39
SAT-1	M4 T6 A6 E1 Q1 R3 K1	R15 K5 T1 A1	K22	V22	D22	F22	N16	S1 N15	L16	Y16	R16
SAT-2	A24 N8 S3 V3	A37 T1	K26 T9 A3	L37 F1	D38	F36 Y2	N8	S7	L8	Y8	R8
SAT-3	T7	T7	K3 P2 E1 X1	V7	D7	H6 F1	N6	N1 S6	L6	Y6	R6
Total	T100 V86 A31 N8 M4 X15	T94 G57 A38 N23 R15 X17	K97 N76 D50 X9	N175 V29 L37 X3	T113 D67 S53 G8 X3	Y179 F59 H6	N250	S234 N16	L250	Y245 T4 N1	R250
% conservación	41	9	40	71	46	73	100	94	100	98	100

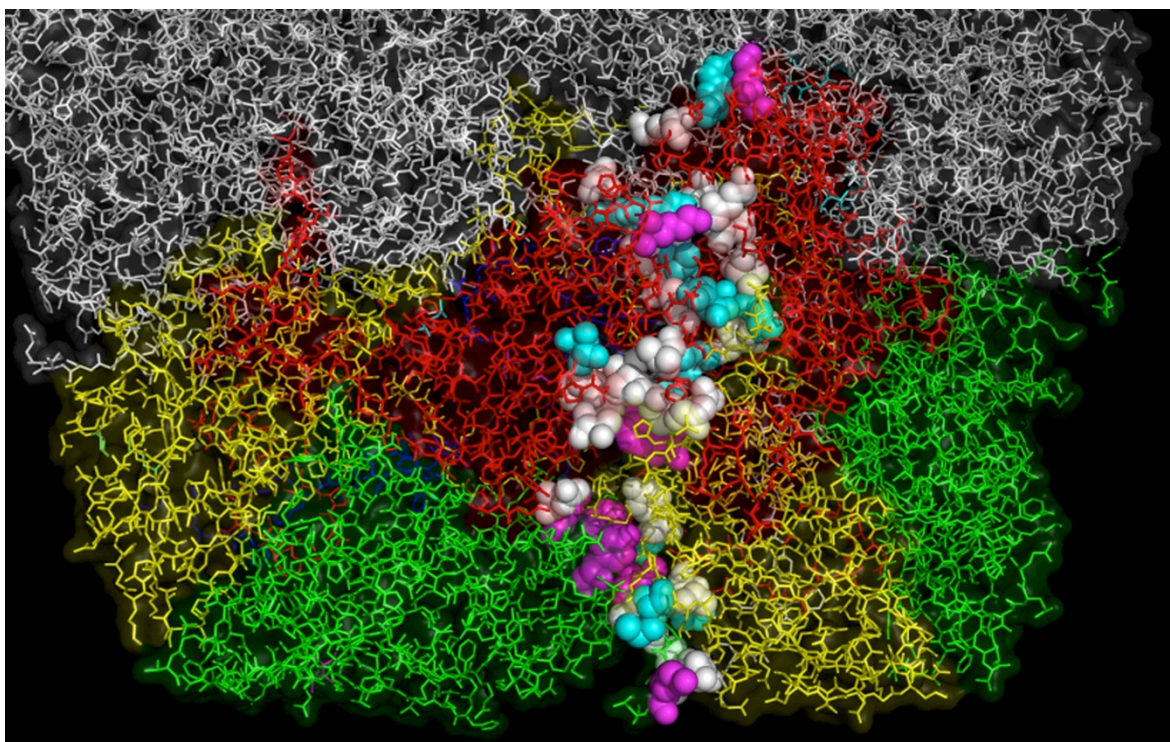
**Figura 37. Conservación en VFA de los 21 residuos localizados en las interfases interprotoméricas de C-S8c1 y analizados en este estudio.** Para cada posición analizada se indican el número de veces en el que se presentó cada aminoácido en cada uno de los siete serotipos y en el total de los aislados de VFA analizados. X: En la posición indicada hay un residuo pero no está determinado. El porcentaje de conservación del residuo en C-S8c1 se indica en la última fila.

Continuación **Figura 37**

Serotipo <sup>a</sup>	Residuo interprotómero <sup>b</sup>									
C-S8c1	K2217	N3013	M3014	T3016	T3099	Q3100	M3130	I3143	Y3169	V3215
C	N34	N35 H2	M35 L2	T37	T37	Q37	M37	I35 X2	Y37	V37
A	N57	G55	L55	T55	T47 A6 F2	Q38 A17	M2 V53	I55	Y55	V10 I45
O	N90	G74	L74	T74	T66 F8	Q74	M74	I74	Y74	V70 I4
Asia 1	N39	N36 G1	M35 R1 L1	T37	T37	Q37	M37	I37	Y37	V34 I3
SAT-1	N16	G25	F25	N25	T15 F10	Q14 A11	T24 I1	I25	Y25	I24 L1
SAT-2	N8	G13	F13	N13	T12 F1	Q1 A12	I8 V4 T1	I13	Y12 F1	V1 I12
SAT-3	N6	G9	F9	N9	T9	A9	T7 H1 V1	I9	Y9	I9
Total	N250	N71 H2 G177	M70 L132 R1 F47	T203 N47	T223 A6 F21	Q201 A49	M150 V58 T32 I9 H1	I248 X2	Y249 F1	V152 I97 L1
% conservación	100	28	28	81	89	80	60	99	100	61

**Figura 37 (continuación).** Conservación en VFA de los 21 residuos localizados en las interfases interprotoméricas de C-S8c1 y analizados en este estudio. Ver leyenda en la página anterior.

En resumen, los resultados obtenidos en esta quinta parte de este trabajo demuestran que, individualmente, la mayoría de las interacciones en la cápsida de VFA entre pares de residuos pertenecientes a protómeros vecinos, a diferencia de las interacciones entre pares de residuos pertenecientes a pentámeros vecinos, son prescindibles durante el ensamblaje de la cápsida de VFA, y su eliminación no afecta en modo alguno a la infectividad del virus y la producción de progenie.



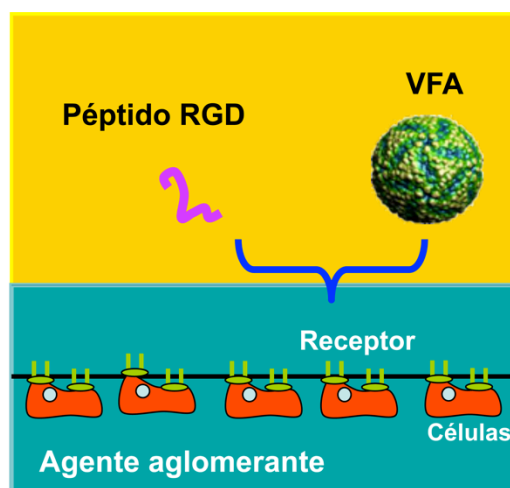
**Figura 38. Localización en VFA de los residuos que participan en la interfase en dos protómeros vecinos.** Estructura atómica de un pentámero en el virión de C-S8c1 (vista parcial). En cada uno de los protómeros contiguos enteramente visibles se representa VP1 en rojo, VP2 en verde y VP3 en amarillo. Los 48 residuos que participan en la interfase (en color blanco) entre los dos protómeros vecinos y los residuos analizados en este estudio se indican en modelo de van der Waals. En magenta se representan los residuos de los grupos I, II y III, y en cian los residuos del grupo IV. Ver descripción más detallada en la [Tablas 11 y 12](#).

#### **4.6. Evaluación del efecto de la aglomeración macromolecular en la actividad de moléculas inhibidoras del reconocimiento entre un virus y su receptor celular**

La mayor parte de los estudios que forman parte de esta tesis doctoral, descritos en los numerales 4.1 a 4.5, han contemplado diversos aspectos del ensamblaje, estabilidad y desensamblaje de viriones y cápsidas vacías de VFA, y tratan de contribuir al conocimiento de estos importantes aspectos del ciclo viral, y al diseño de vacunas mejoradas contra la fiebre aftosa. No obstante, en nuestro laboratorio estamos también interesados en el desarrollo de agentes antivirales que inhiban el ensamblaje de cápsidas víricas y otros procesos de reconocimiento proteína-proteína implicados en el ciclo vírico.



Una predicción de la teoría de aglomeración molecular es que el efecto inhibidor de una molécula pequeña sobre un proceso de reconocimiento macromolecular se verá reducido en condiciones aglomeradas como las presentes en fluidos intra- y extracelulares en el organismo (Minton, 1993). Como sexta y última parte de este trabajo de doctorado, nos propusimos comprobar experimentalmente esta importante predicción. Para ello, utilizamos como sistema modelo la interacción entre el virión de VFA C-S8c1 y su receptor en la membrana de células BHK-21c2, y como inhibidor de pequeño tamaño un péptido sintético que mimetiza el sitio de unión al receptor celular en la cápsida del virus e inhibe competitivamente la interacción virus-célula (Mateu *et al.*, 1996; **Figura 39**). Como agente aglomerante inerte, que mimetiza las condiciones de aglomeración macromolecular fisiológicas, utilizamos Ficoll 70 (numeral 3.19).

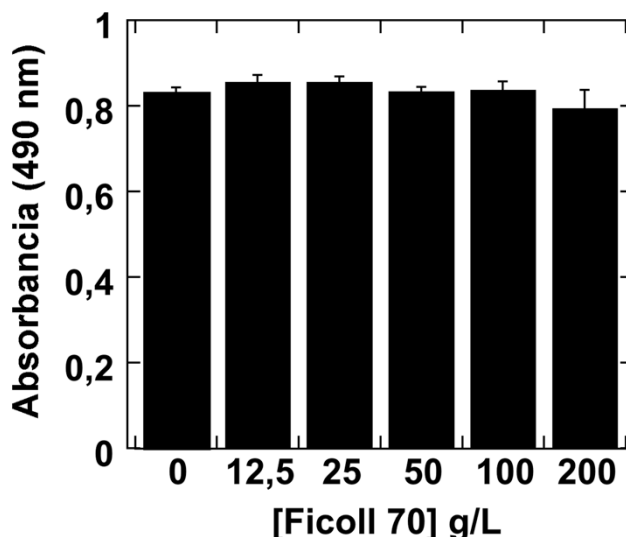


**Figura 39.** Esquema del sistema modelo utilizado para evaluar el efecto de la aglomeración molecular sobre la inhibición por un péptido sintético de la unión de VFA a su receptor en la membrana de las células hospedadoras en cultivo (para una descripción, ver texto).

#### 4.6.1. Evaluación de la toxicidad del agente de aglomeración macromolecular

En primer lugar, se determinó la concentración máxima de Ficoll 70 que podría utilizarse en los ensayos de inhibición del reconocimiento virus-célula sin ejercer un efecto tóxico sobre las células utilizadas en el ensayo. Los resultados (**Figura 40**) no mostraron efecto citotóxico significativo en varios experimentos, ni siquiera a una concentración de Ficoll 70 de 200 g/L. Por tanto, para los ensayos de inhibición viral elegimos la

concentración de 100 g/L, claramente no tóxica, y adecuada para imitar las condiciones de aglomeración macromolecular que ocurren en fluidos fisiológicos.

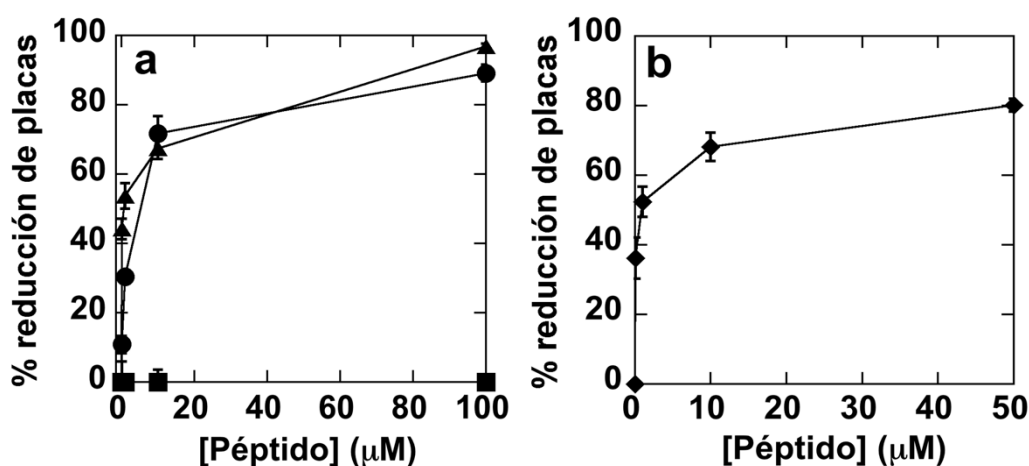


**Figura 40.** Evaluación del efecto citotóxico de Ficoll 70 sobre células BHK-21c2 en cultivo. Los valores de la absorbancia son directamente proporcionales a la viabilidad celular. Los valores promedio y sus desviaciones estándar corresponden a seis mediciones para cada una de las concentraciones analizadas.

### 4.6.2. Evaluación de la actividad inhibitoria de péptidos sintéticos sobre el reconocimiento VFA-receptor celular

A continuación se determinaron las concentraciones de péptidos adecuadas para inhibir el reconocimiento VFA-célula en ausencia de agente aglomerante en un ensayo *ex vivo* que ya había sido previamente puesto a punto. La capacidad inhibitoria del péptido sobre el reconocimiento virus-célula se determina a través de la inhibición de la infectividad de VFA sobre células susceptibles (Mateu *et al.*, 1996). Se utilizaron los péptidos A15 y A19 (en su forma libre o conjugado a una proteína de gran tamaño, KLH); el péptido variante A15<sub>RGE</sub>, que contiene una mutación en el sitio de reconocimiento del receptor celular y es completamente inactivo, se utilizó como control negativo (numeral 3.4). Los resultados se muestran en la **Figura 41**. Como se esperaba, A15<sub>RGE</sub> no tuvo ningún efecto inhibitorio detectable, aún a una concentración de 100  $\mu$ M (**Figura 41a**). En cambio, A15 y A19 inhibieron fuertemente el reconocimiento virus célula y la infectividad de VFA, presentando un IC<sub>50</sub> similar de  $\sim 1 - 2 \mu$ M, y alcanzando casi un 100% de

inhibición a una concentración de 100  $\mu\text{M}$  (**Figura 41a**). El péptido conjugado A19-KLH multivalente fue tan activo como el péptido libre, presentando un  $\text{IC}_{50}$  de  $\sim 1 \mu\text{M}$  (**Figura 41b**). Incidentalmente, este último resultado indica que la elevada multivalencia de un inhibidor (A19) en una misma molécula (KLH) no aumenta el efecto inhibitor sobre el reconocimiento virus-receptor en la superficie de la célula huésped, respecto al péptido libre monovalente. A partir de los resultados de estos experimentos, se eligió un rango de concentración del péptido (sea en forma libre o acoplado a KLH) de entre 0,1  $\mu\text{M}$  – 100  $\mu\text{M}$  para la evaluación del efecto del agente aglomerante sobre la inhibición del reconocimiento virus-célula.



**Figura 41.** Inhibición de la infectividad de VFA por péptidos sintéticos en ausencia de un agente de aglomeración macromolecular. (a) inhibición por los péptidos libres A19 (triángulos), A15 (círculos), o A15<sub>RGE</sub> (cuadrados). (b) inhibición por el péptido conjugado A19-KLH. Los valores para los péptidos A19, A15, A15<sub>RGE</sub> y A19-KLH corresponden respectivamente al promedio de nueve, cuatro, cuatro o siete mediciones obtenidas en tres, dos, dos, o tres experimentos independientes. Se indican las desviaciones estándar.

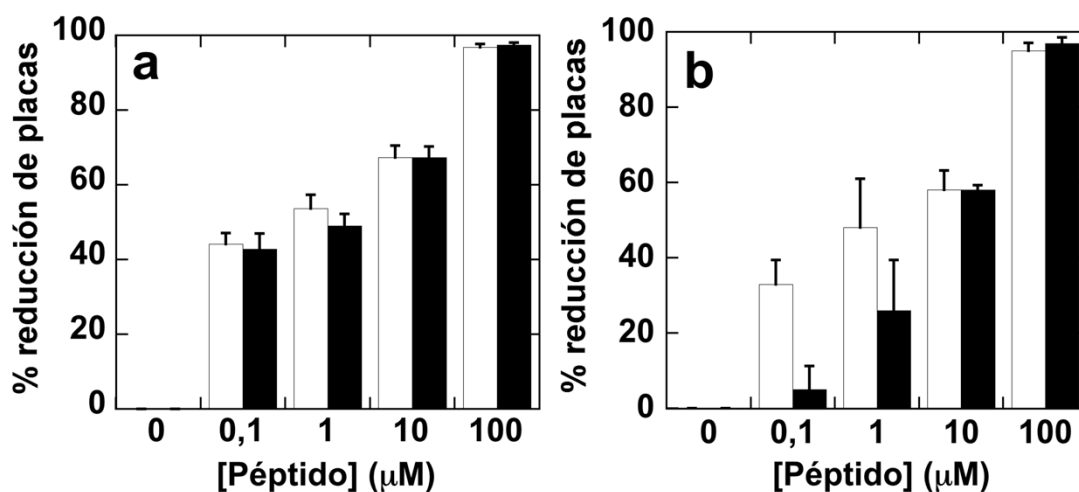
#### 4.6.3. Evaluación del efecto de aglomeración macromolecular sobre la inhibición por péptidos del reconocimiento VFA-receptor celular

Una vez se determinaron las concentraciones apropiadas del agente de aglomeración molecular y de los péptidos inhibitorios, investigamos el efecto de la aglomeración macromolecular sobre la inhibición del reconocimiento VFA-célula y la infectividad por los péptidos sintéticos. La relación entre el número de sitios de unión (receptores VFA) en la membrana de células susceptibles y el número de partículas víricas de VFA circulantes

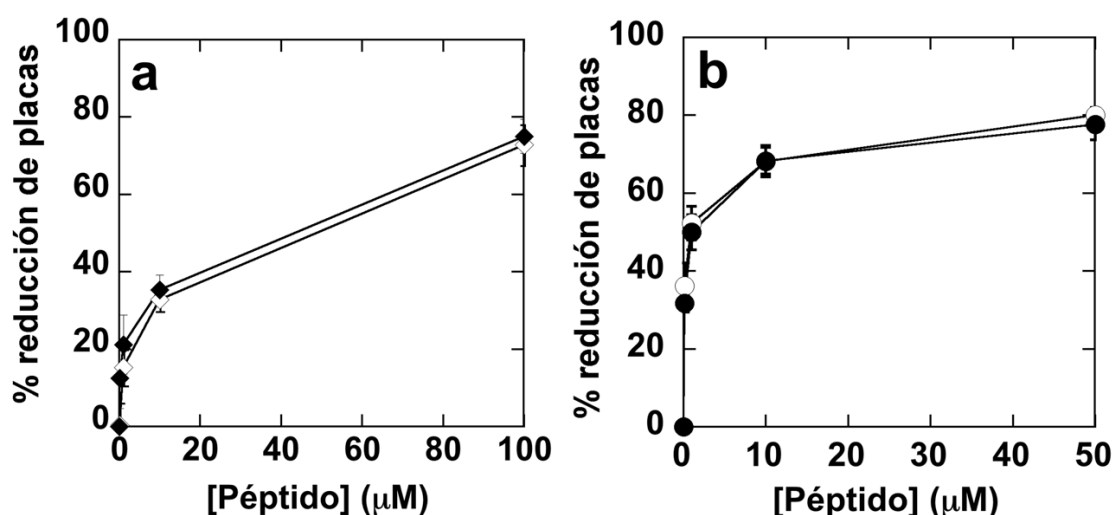


puede variar ampliamente, tanto en infecciones de laboratorio como en infecciones naturales. Por lo tanto, decidimos analizar los efectos de la aglomeración macromolecular utilizando dos relaciones partícula vírica:receptor muy diferentes, las cuales se han estimado como  $10^{-4}$  y 1 (numeral 3.19). El número de sitios de unión (receptores celulares) y otras condiciones experimentales se mantuvieron invariantes.

Los resultados de la comparación se presentan en la **Figura 42**. Cuando se utilizó la relación partícula vírica:receptor más baja no se encontraron diferencias significativas en la actividad inhibitoria del péptido libre A19 en ausencia o presencia de 100g/L de Ficoll 70 (**Figura 42a**). Lo mismo se observó cuando se utilizó A15 o el conjugado A19-KLH como inhibidor (**Figura 43**). Por el contrario, cuando se utilizó la relación partícula vírica:receptor más elevada, la actividad inhibitoria del péptido A19 fue significativamente reducida en presencia del agente aglomerante respecto a su ausencia (**Figura 42b**). La disminución fue substancial sólo a concentraciones de péptido bajas (0,1-1  $\mu$ M). En estas condiciones, se necesitó una concentración de péptido 20 veces más alta para lograr en el medio aglomerado el mismo efecto inhibitorio observado en solución diluida.



**Figura 42.** Inhibición de la infectividad de VFA por el péptido A19 en ausencia o presencia de un agente de aglomeración macromolecular. La relación partícula vírica:receptor es  $10^4$  veces más elevada en el panel (b) que en el (a). Barras blancas: ausencia de Ficoll 70; barras negras: presencia de Ficoll 70 a 100 g/L. Los valores en los paneles (a) y (b), representan respectivamente el promedio de 9 o 4 mediciones obtenidas en tres o dos experimentos independientes. Se indican las desviaciones estándar.

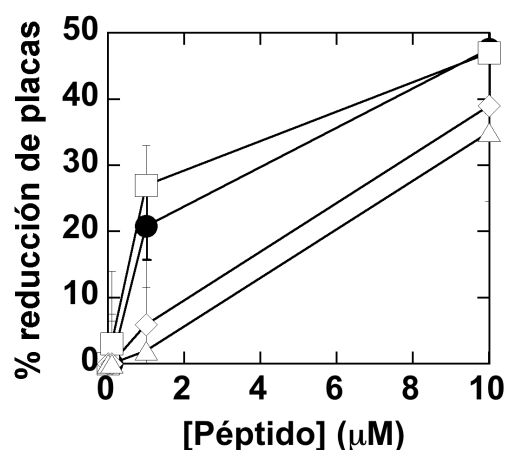


**Figura 43.** Inhibición de la infectividad de VFA por el péptido A15 (a) o el conjugado A19-KLH (b) en ausencia o presencia de un agente de aglomeración macromolecular. Se utilizó la misma relación partícula vírica:receptor del experimento de la Figura 42a. Símbolos blancos: ausencia de Ficoll 70; símbolos negros: presencia de Ficoll 70 a 100 g/L. Los valores en los paneles (a) y (b) corresponden al promedio de tres experimentos independientes, cada uno por duplicado (a) o triplicado (b). Se indican las desviaciones estándar.

Para confirmar que la reducción en la actividad inhibitoria del péptido a una relación alta partícula vírica:receptor se debe realmente a la presencia del agente aglomerante, se realizó un ensayo dosis-respuesta, utilizando diferentes concentraciones de Ficoll 70 (0, 50, 100 y 200 g/L). Como se esperaba, se observó una dependencia inversa en la concentración del Ficoll con respecto a la actividad inhibitoria del péptido, tanto a bajas concentraciones de péptido (1 μM) como a mayores concentraciones (10 μM) (Figura 44). Por ejemplo, en ausencia de Ficoll, una concentración de péptido de 1 μM redujo un 25% la infectividad del virus. En presencia de Ficoll a 50 g/L la inhibición se mantuvo en un 25%, a 100 g/L se redujo a un 5% y a 200 g/L el péptido no presentó actividad inhibitoria alguna.

En resumen, los resultados obtenidos en esta sexta y última parte de nuestro estudio demuestran experimentalmente, aunque de modo dependiente de las condiciones utilizadas, una importante predicción realizada por la teoría de aglomeración macromolecular: la aglomeración molecular reduce la actividad inhibitoria de pequeñas moléculas (como un péptido sintético) sobre un proceso de reconocimiento macromolecular (como una interacción virus-receptor celular). En nuestro laboratorio

hemos confirmado doblemente esta predicción, utilizando además del modelo aquí descrito, un modelo de inhibición del ensamblaje de la cápsida de VIH-1 por un péptido sintético (Rincón *et al.*, 2011; ver Discusión).



**Figura 44.** Inhibición de la infectividad de VFA por el péptido A19 en ausencia o presencia de diferentes concentraciones de un agente de aglomeración macromolecular. Se utilizó la misma relación partícula vírica:receptor del experimento de la [Figura 42b](#). El experimento se realizó en ausencia de Ficoll 70 (círculos negros), o en presencia de 50 g/L (cuadrados), 100 g/L (diamantes) o 200 g/L (triángulos) de Ficoll 70. Los valores corresponden al promedio de dos experimentos independientes, cada uno por duplicado. Se indican las desviaciones estándar.

## **DISCUSIÓN**



## 5. DISCUSIÓN

### 5.1. Repulsiones electrostáticas entre pentámeros contribuyen a la inestabilidad del virión de VFA

La investigación del mecanismo de acción de la mutación A2065H en el virión de VFA nos ha llevado a descubrir la existencia de repulsiones electrostáticas entre los pentámeros que forman la cápsida de este virus. Nuestro propósito al introducir esta mutación fue estabilizar el virión mediante una alteración en el potencial electrostático de la cápsida que aumentara la atracción entre pentámeros. Es importante resaltar en primer lugar que nuestros resultados demuestran que A2065H no sólo estabiliza el virión, sino también la cápsida vacía, por lo que su efecto tiene que ver con la estructura de la cápsida, y no con las interacciones entre ésta y el ARN. El aumento de fuerza iónica, que apantalla las cargas, eliminó como se había predicho el efecto estabilizante de A2065H, lo que sugiere que, como se esperaba, esta mutación aumenta la atracción electrostática neta entre pentámeros. Sin embargo, el aumento de fuerza iónica no desestabilizó el virión mutante, sino que estabilizó el virión parental. Por tanto, el aumento en la atracción electrostática *net*a entre pentámeros en A2065H no parecía estar causado por el establecimiento de nuevas interacciones atractivas entre residuos con cargas de distinto signo pertenecientes a pentámeros vecinos, sino por una reducción de una repulsión electrostática entre residuos con cargas del mismo signo, que ocurre incluso a pH neutro (fisiológico).

La introducción de la mutación A2065H introduce un grupo imidazol cargado positivamente en un residuo expuesto al solvente y con la cadena lateral orientada hacia el exterior, por lo que es muy probable que no cause ningún tipo de reordenamiento conformacional en la cápsida. Por lo tanto, propusimos la hipótesis de que su efecto estabilizante se debe a que la carga positiva introducida reduce las repulsiones culombianas entre algunos carboxilatos cercanos a la posición 2065 y a las interfases entre pentámeros. La eliminación individual en el virión parental C-S8c1 de 9 carboxilatos cercanos a A2065 (por protómero), mediante mutación isostérica, reveló que cada una de las 4 mutaciones D2068N, E2086Q, D3134N y D3195N aumenta considerablemente la estabilidad térmica de VFA frente a la disociación en pentámeros, en comparación con el

virus parental. La eliminación simultánea de dos de estos 4 carboxilatos no resultó en ningún caso más estabilizante que la eliminación de sólo uno de ellos. Esto es consistente con la idea de que basta la eliminación de un único carboxilato por protómero para eliminar casi completamente la repulsión electrostática entre pentámeros que desestabiliza el virión, aunque varios carboxilatos están implicados en la misma. Los carboxilatos de estos 4 residuos son precisamente los que se encuentran expuestos al solvente en la superficie del virión, lo que es consistente con la idea de que el efecto estabilizante de la eliminación de la carga de los carboxilatos (con un mínimo cambio adicional en la estructura química) se debe esencialmente a la eliminación de repulsiones electrostáticas, y no a otros efectos. Por el contrario, los carboxilatos cercanos cuya sustitución no aumentó, o incluso disminuyó la estabilidad, presentan su cadena lateral enterrada en la cápsida, por lo que los efectos diversos de su mutación se deben seguramente a una combinación de factores estéricos e interacciones perdidas o ganadas.

Estos resultados indican que en el virión de VFA existe una repulsión electrostática entre pentámeros en la que están implicados al menos los carboxilatos de D2068, E2086, D3134 y D3195. La eliminación de cualquiera de ellos reduce esta repulsión entre pentámeros, al igual que lo hace la fuerza iónica elevada (por apantallamiento de cargas) o la mutación A2065H. La estabilización causada por la mutación A2065H parece deberse a la neutralización de alguna(s) de estas cargas. Si el efecto estabilizante de la mutación se debiera a otra causa y mantuviera las repulsiones electrostáticas entre pentámeros debidas a los carboxilatos, sería de esperar que el aumento de fuerza iónica aumentara aún más la estabilidad de A2065H, cosa que no ocurrió.

Estas observaciones se suman a las realizadas con algunos otros virus, estructural y funcionalmente muy diferentes de VFA. Observaciones pioneras de Caspar sugirieron la existencia de repulsión entre carboxilatos en la cápsida del virus del mosaico del tabaco (TMV), que también se propusieron para algún otro virus de plantas (Caspar, 1963; Bancroft, 1970; Wang *et al.*, 1998). Posteriores estudios con TMV (Culver *et al.* 1995) demostraron que las repulsiones electrostáticas entre Glu50 y Asp77 en la cápsida de TMV favorecen significativamente el desensamblaje del virión. La substitución de estos pares de carboxilatos en las interfases entre subunidades de la cápsida por las correspondientes amidas estabilizaron la asociación proteína-proteína. Lu *et al.*, (1996) confirmaron de igual

manera que otras mutaciones que eliminaban carboxilatos inhibían significativamente el desensamblaje de TMV.

Nuestro grupo de investigación ha demostrado, mediante un análisis termodinámico riguroso utilizando ciclos de doble mutante, la existencia de repulsiones electrostáticas en la cápsida de VIH-1. Encontramos, en concreto, que la baja afinidad de dimerización del dominio C-terminal (CTD) de la proteína de la cápsida (CA) de VIH-1 se debe a repulsiones electrostáticas entre los dos monómeros, entre ellas la repulsión entre los carboxilatos de E180 de cada subunidad. Estas repulsiones están conservadas en diversos aislados de VIH (del Álamo *et al.*, 2003; del Álamo y Mateu, 2005). De forma similar a lo observado con CTD, se ha propuesto la existencia de repulsiones electrostáticas entre dominios N-terminales (NTD) de CA de VIH-1 (Douglas *et al.*, 2004). El conjunto de estos y otros resultados revela que la inestabilidad de la cápsida de VIH-1 y virus relacionados se debe, en parte, a repulsiones electrostáticas evolutivamente conservadas (revisado en Mateu, 2009).

Por lo tanto, la existencia de repulsiones electrostáticas entre subunidades de la cápsida incluso a pH neutro (fisiológico) puede ser un fenómeno muy general en virus. El establecimiento de estas repulsiones constituye probablemente una ventaja adaptativa porque acerca la estructura de la cápsida a un nivel de estabilidad cercano al punto de desensamblaje o cambio conformacional relacionado con desencapsidación. Es decir, estas repulsiones electrostáticas constituirían, en virus como VFA y otros, un método de “ajuste fino” de la estabilidad basal del virión. Una vez un virión, como por ejemplo VFA, ha sido evolutivamente “ajustado” mediante la introducción de repulsiones electrostáticas a un nivel de estabilidad suficientemente bajo, existirán muchas opciones para aportar la pequeña energía adicional requerida para la liberación del material genético. En el caso de VFA, los resultados indican que la liberación del ARN vírico en la célula infectada ocurre mediante una ligera acidificación en el endosoma (numeral 1.3.3). El descubrimiento de estas repulsiones electrostáticas en viriones diversos suministra un blanco muy atractivo para el diseño de antivirales, y para la estabilización mediante ingeniería de proteínas de diversos tipos de partículas víricas con fines nanotecnológicos o biotecnológicos, incluyendo el diseño de vacunas (numeral 5.3).

En conclusión, nuestra investigación del mecanismo molecular de la termoestabilización del virión de VFA mediante la mutación A2065H i) reveló la



existencia de repulsiones electrostáticas entre carboxilatos en la cápsida de VFA incluso a pH neutro; ii) permitió explicar el efecto de A2065H mediante la neutralización de la carga de algunos de esos carboxilatos y la reducción de la repulsión electrostática entre pentámeros; y iii) nos llevó a una estrategia racional exitosa de estabilización del virión de VFA mediante eliminación de ciertos carboxilatos por mutación isostérica.

El mecanismo molecular por el que la doble mutación D3069E/T2188A estabiliza VFA frente a su disociación térmica no ha sido investigado en detalle aún. Es importante resaltar que nuestros resultados demuestran que esta doble mutación, como A2065H, no sólo estabiliza el virión, sino también la cápsida vacía, por lo que su efecto es igualmente intrínseco de la estructura de la cápsida. También debe resaltarse nuestra observación de que el aumento de fuerza iónica aumenta la termoestabilidad de VFA parental (en el que hemos demostrado que existen repulsiones electrostáticas entre carboxilatos), pero no la de D3069E/T2188A. Si la doble mutación generara nuevas interacciones no covalentes (no iónicas) entre pentámeros que aumentaran la estabilidad neta, pero manteniendo las repulsiones electrostáticas entre pentámeros, sería de esperar que el aumento de fuerza iónica aumentara aún más la estabilidad de D3069E/T2188A, cosa que no ocurrió. Una posibilidad consistente con los datos disponibles es que la doble mutación introduzca nuevas interacciones iónicas atractivas entre pentámeros (idea que de hecho llevó al diseño del mutante D3069E). Estas interacciones atractivas introducidas compensarían aproximadamente (sin eliminar) las repulsiones naturalmente presentes en VFA. En tal caso, el aumento de fuerza iónica anularía tanto las interacciones atractivas adicionales en D3069E/T2188A como las repulsiones en este mutante y en el virión parental, y ambos viriones presentarían la misma termoestabilidad, como hemos observado.

Los nuevos resultados son, por tanto consistentes con el diseño original de este mutante, basado en la posibilidad de que la mutación D3069E aumente la atracción electrostática con K2198 del pentámero vecino, al acercar el carboxilato a la amina. Esta mutación por sí misma compromete la viabilidad del virus, tal vez dificultando en exceso la desencapsidación. Sin embargo, la mutación secundaria T2188A, que en sí misma no afecta a la estabilidad, se encuentra a menos de 15 Å de 3069 y de la interfase interprotómero. Por tanto, podría facilitar un reordenamiento conformacional de esta región de la interfase entre pentámeros, que provocaría la ruptura de algunas interacciones interpentaméricas, disminuyendo el efecto excesivamente estabilizante de la mutación

D3069E. La posibilidad de un reordenamiento conformacional causado por la mutación T2188A en presencia de D3069E viene apoyada por nuestra observación de que el triple mutante A2065H/D3069E/T2188A no es más estable que el virión parental. Es decir, que en presencia de D3069E/T2188A, A2065H no ejerce ningún efecto estabilizante. Esto podría explicarse si el putativo cambio conformacional causado por D3069E/T2188A alejara H2065 de los carboxilatos vecinos (cuya carga neutraliza en ausencia de las mutaciones D3069E/T2188A). Esta hipótesis queda, sin embargo, por investigar.

## **5.2. Mutaciones compensatorias en las interfases entre pentámeros y su relación con estabilidad de la cápsida de VFA**

Nuestra investigación del mecanismo de acción de mutaciones compensatorias en las interfases entre pentámeros en el virión de VFA se centró en la mutación letal primaria H3141A y la mutación secundaria compensatoria N2019H. La mutación N2019H ocurre en un “*hot spot*” de compensación y restaura la viabilidad perdida a causa de diferentes mutaciones primarias localizadas alrededor de 2019. La mayoría de estas mutaciones primarias, incluyendo H3141A, eliminan una carga positiva cercana a la interfase, y la mutación compensatoria N2019H reintroduce una carga positiva cerca de donde estaba la original. Además, el residuo H3141 ha sido implicado en la desestabilización del virión a pH ácido. Por tanto, existía la posibilidad de que cambios en el potencial electrostático y el establecimiento de nuevas atracciones o repulsiones electrostáticas entre pentámeros (objeto continuado de estudio en esta tesis), estuvieran implicados en la pérdida de viabilidad a causa de la mutación H3141A, y su restauración mediante la mutación N2019H.

Razonando mediante analogía con nuestras observaciones sobre el efecto estabilizante de la mutación A2065H, nuestra hipótesis fue que la mutación letal H3141A podría estabilizar en exceso las interacciones entre pentámeros, por ejemplo eliminando interacciones repulsivas con otros residuos vecinos cargados positivamente. La mutación compensatoria restauraría la carga positiva local perdida, restaurando la menor estabilidad del virión no mutado en un contexto genético diferente, pero electrostáticamente similar.

Hasta el momento, la enorme dificultad de obtener cantidades suficientes de cápsidas vacías recombinantes de VFA razonablemente purificadas ha impedido cualquier estudio estructura-función de la cápsida de este virus que implique mutaciones letales. Por ello, dedicamos un gran esfuerzo a la obtención y purificación de cápsidas vacías recombinantes, con la ayuda de los Dres. E. Martínez-Salas y G. Belsham. En nuestro conocimiento, el estudio de los efectos de las mutaciones compensatorias H3141A y N2019H que hemos iniciado en esta tesis es el primer estudio estructura-función en la cápsida de VFA que implica una mutación letal, y abre el camino a muchos otros estudios de este género en este virus.

Nuestros resultados con cápsidas vacías mutantes (aun pendientes de confirmación) indican que H3141A aumenta sustancialmente, como habíamos propuesto, la termoestabilidad de la cápsida de VFA frente a la disociación a pentámeros. Sin embargo, contrariamente a lo que postulamos, la mutación N2019H en presencia de la mutación H3141A no restableció la menor estabilidad de la cápsida parental, sino que aumentó aún más la termoestabilidad de la cápsida frente a la disociación. Este efecto estabilizante de N2019H no depende de la presencia de la mutación H3141A, ya que el mutante sencillo N2019H resultó también ser mucho más estable que la cápsida parental y la mutante H3141A. Una posibilidad para explicar el efecto estabilizante de N2019H es que neutralice la carga negativa más próxima, la del carboxilato de E2059 del mismo protómero, que se encontraría a menos de 4 Å de H2019. Esto reduciría una posible repulsión electrostática entre E2059 y otros residuos cercanos y cargados negativamente pertenecientes al pentámero vecino, por ejemplo con D2106 y otros residuos que se encuentran a unos 12 Å de E2059. Esta posibilidad queda por investigar.

En cualquier caso, los resultados obtenidos no son consistentes con nuestra hipótesis de que N2019H restaura la viabilidad perdida a causa de la mutación H3141A mediante la restauración de la menor estabilidad de la cápsida no mutada. Nuestros resultados indican, en cambio, que el mecanismo de compensación está relacionado con el efecto de estas mutaciones sobre el ensamblaje de la cápsida. Encontramos que H3141A interfiere con el correcto ensamblaje de la cápsida, reduciendo severamente la cantidad de cápsidas producidas, y que la mutación compensatoria N2019H en el doble mutante H3141A/N2019H restaura el ensamblaje normal de la cápsida. Este punto debe aún ser confirmado mediante experimentos adicionales.

Es además importante resaltar aquí que se ha postulado que H3141 y H3144 juegan un papel importante en el desensamblaje de la cápsida de VFA a pH ácido (Acharya *et al.*, 1989; Curry *et al.*, 1995; Twomey *et al.*, 1995; van Vlijmen *et al.*, 1998; Ellard *et al.*, 1999; numeral 1.3.3.). En los endosomas de las células infectadas, el pH ácido conduciría a la protonación más permanente de estas histidinas cerca de las interfases entre subunidades pentaméricas que aumentarían su repulsión electrostática con el dipolo de una hélice  $\alpha$  y/o con otros residuos cargados positivamente situada en el pentámero vecino, facilitando la disociación de la cápsida. Será por tanto, interesante comprobar el efecto sobre la estabilidad de la cápsida de las mutaciones H3141A, N2019H y H3141A/N2019H en función del pH, en vez de exclusivamente a pH neutro como hemos hecho en nuestros estudios iniciales.

A este respecto, cabe mencionar que el grupo del Prof. Sobrino ha demostrado que la mutación N1017D en la cápsida de VFA C-S8c1 es responsable de la mayor resistencia de variantes naturales de VFA frente a la inactivación a pH ácido (Martín-Acebes *et al.*, 2011). Nosotros hemos comprobado, en colaboración con ese grupo, que esta misma mutación es responsable de una mayor resistencia del virión frente a la disociación en pentámeros dependiente de pH. Por tanto, es posible que el efecto estabilizante a pH ácido de la mutación N1017D se deba a que la introducción de la carga negativa adicional neutraliza la carga positiva de H3144 (especialmente próxima) (Martín-Acebes *et al.*, 2011). Esta posibilidad queda también para ser investigada.

### **5.3. Estabilización de partículas de VFA para el desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre aftosa**

#### **5.3.1. Vacunas basadas en viriones termoestables inactivados químicamente**

Los estudios abordados en esta tesis han revelado una estrategia racional para obtener viriones y cápsidas de VFA más estables. Esta estrategia se basa en la eliminación de interacciones electrostáticas repulsivas entre los pentámeros que forman la cápsida, mediante neutralización de su carga a través de la introducción de un residuo de carga opuesta (A2065H) o mediante mutación de alguno de los residuos implicados (D2068N,

E2086Q, D3134N, D3195N). Además, nuestros estudios sobre el mecanismo de actuación de mutaciones compensatorias que implican, igualmente, la eliminación o reintroducción de cargas cerca de las interfases entre pentámeros nos permitieron identificar otras mutaciones estabilizantes (H3141A, N2019H, H3141A/N2019H).

En total, en esta tesis doctoral hemos obtenido, mediante ingeniería de proteínas racional, seis variantes de VFA C-S8c1 (D2068N, E2086Q, D3134N, D3195N, N2019H, H3141A/N2019H) que mantienen una infectividad similar a la del virus parental, pero que son sustancialmente, o incluso dramáticamente, más estables que el parental frente a la disociación inducida por calor. Estos variantes se suman a otros dos variantes de infectividad similar a C-S8c1 (A2065H y D3069E/T2188A; Mateo *et al.*, 2008) para los que hemos confirmado que son igualmente mucho más estables que C-S8c1. La mayor termoestabilidad de la mayoría de estos 8 variantes termoestables de VFA se ha conseguido mediante modificación del potencial electrostático de la cápsida a través de sustituciones sencillas de aminoácidos.

El desarrollo de una vacuna contra la fiebre aftosa basada, como las actuales, en virus inactivado, pero menos dependiente de una estricta cadena de frío podría basarse en la utilización de alguno de estos variantes termoestables, u otros realizados siguiendo el mismo abordaje. Naturalmente, para el desarrollo práctico de tales vacunas termoestables sería necesario realizar una serie de análisis y procedimientos, algunos de los cuales se mencionarán a continuación. Algunos de los análisis más básicos (puntos 1 a 4) los hemos realizado y detallado en estudios previos (Mateo *et al.*, 2008; Luna, 2010) o como parte de esta tesis, utilizando como ejemplo VFA termoestables A2065H y D3069E/T2188A, con resultados plenamente positivos. Los requisitos que deben cumplir estos viriones modificados para un posible uso vacunal incluyen:

1-Velocidad de replicación y producción de progenie similares a las de cepas vacunales en uso, necesarias para la producción a gran escala de vacunas.

2- Estabilidad genética durante la amplificación masiva del virus en cultivo, asimismo necesaria para la producción a gran escala sin que se pierda la mutación estabilizante.

3- Facilidad de inactivación mediante reactivos normalmente utilizados (como BEI) igual o superior a la de cepas vacunales, para no aumentar el riesgo de producir lotes de vacuna que contengan viriones infecciosos.

4- Antigenicidad indistinguible de la de la cepa vacunal de la que derivan los variantes termoestables, tanto antes como después del tratamiento inactivante.

5- Inmunogenicidad de la vacuna en animales hospedadores (vacas, cerdos) igualmente indistinguible de la de la cepa vacunal de la que derivan. En variantes termoestables que hemos analizado no hay diferencias de antigenicidad con la cepa vacunal, y únicamente se introduce un cambio de aminoácido, lo que es un buen principio para suponer que tampoco habrá ninguna diferencia de inmunogenicidad. No obstante, este es por supuesto un punto crucial que deberá ser comprobado.

6- Termoestabilidad de la vacuna en condiciones de almacenamiento y uso reales. Igualmente, la sustancialmente mayor estabilidad de los variantes construidos a 42°C (y, en el caso de A2065H y D3069E/T2188A al menos, también a 4°C) y el hecho de que únicamente contienen un cambio de aminoácido, hace suponer que serán también más estables una vez preparados en forma de vacuna. Pero este es otro punto crucial que deberá ser comprobado.

7- Validez de al menos una de las 8 mutaciones termoestabilizantes identificadas sobre una cepa vacunal prototipo de serotipo C en el contexto genético de la cepa (o cepas) vacunales que deban utilizarse en función de los virus circulantes en un determinado momento y país. En este sentido, cabe destacar que la mayoría de las mutaciones responsables del incremento de termoestabilidad implican residuos y se encuentran en regiones muy conservadas dentro de un serotipo e incluso entre serotipos de VFA. Por lo tanto, es esperable que al menos alguna de ellas sirva para estabilizar diferentes cepas vacunales, incluso de diferentes serotipos. No obstante, de nuevo este es otro punto que deberá ser comprobado caso por caso.

8- Estrategia adecuada y suficientemente sencilla para introducir la mutación o mutaciones termoestabilizantes en la cepa vacunal adecuada, en función de los virus circulantes. Este puede ser un punto a considerar muy cuidadosamente para el desarrollo real de una vacuna termoestable basada en virus inactivado químicamente. Evidentemente, la introducción de una mutación estabilizante en la actual o en una nueva cepa vacunal debe hacerse sobre el clon infeccioso. Por tanto, el desarrollo de una vacuna termoestable requerirá la construcción de un clon infeccioso del virus circulante *o de uno antigénicamente similar al mismo*. Esto puede ser relativamente asequible sin un esfuerzo adicional muy grande con respecto a lo que hoy conlleva la actualización de una vacuna

contra la fiebre aftosa. Este proceso requiere actualmente identificar el o los virus circulantes frente a los que se quiere proteger y realizar ensayos de protección con la cepa vacunal actual del mismo serotipo. Si ésta no es efectiva, alguno de los virus circulantes debe adaptarse para su crecimiento en cultivo para producir la nueva vacuna. La nueva cepa vacunal y la nueva vacuna deben, necesariamente, someterse a varios de los análisis mencionados los puntos anteriores.

Se dispone de clones infecciosos de diferentes serotipos, y se conocen bien las limitadas regiones antigénicas en la cápsida de VFA (Mateu, 1995). Para obtener un clon infeccioso que produjera viriones con la misma antigenicidad e inmunogenicidad que el virus circulante, podría ser suficiente introducir en el clon infeccioso prototipo del mismo serotipo que la cepa vacunal (ya disponible) las modificaciones genéticas necesarias para conferir una especificidad antigénica similar a la de la cepa circulante. Para ello, dada la gran similitud estructural de variantes de VFA incluso de diferente serotipos, podría bastar con subclonar algunos segmentos de las proteínas de la cápsida del virus circulante (correspondientes a los sitios antigénicos) en el clon infeccioso disponible. Este abordaje se ha utilizado en el laboratorio, por ejemplo, para cambiar la especificidad antigénica de proteínas de la envuelta del virus de la gripe, o un sitio inmunodominante de VFA. En el mismo proceso se introducirían mediante mutagénesis dirigida la mutación (o mutaciones) termoestabilizantes, y quizá alguna otra mutación adecuada para refinar la inmunogenicidad, o mejorar alguna otra propiedad de la cepa vacunal final. Además, la actualización de la vacuna para un serotipo circulante en un determinado país se lleva a cabo muy infrecuentemente, lo que hace aún menos significativo ese esfuerzo adicional para el desarrollo completo de la nueva vacuna.

En resumen, consideramos que, una vez identificadas mutaciones termoestabilizantes, como hemos realizado en nuestro estudio, la termoestabilización de una nueva cepa vacunal de VFA es un proceso perfectamente realizable y asumible. La introducción de esta nueva etapa en el proceso de producción de la vacuna no encarecería ni ralentizaría significativamente el proceso completo, ni debería aumentar apenas el precio de la vacuna.

A pesar de su similar coste de producción, la utilización de vacunas contra la FA basadas en estos viriones de mayor termoestabilidad admitiría una cierta relajación en la cadena de frío. Muy especialmente, consentiría las inevitables rupturas parciales de la

misma sin que ocurra una reducción dramática de la inmunogenicidad de la vacuna y la aparición de brotes de enfermedad en animales vacunados con vacunas estropeadas por el calor. Incluso sin fallos en la cadena de frío, la disminución en la cantidad de viriones disociados en la vacuna mantendría una óptima inmunogenicidad de la misma hasta su aplicación en el campo. Otra potencial ventaja potencial sería, tal vez, la reducción de la posibilidad de que en animales que entren en contacto con el virus se establezca una infección persistente inaparente y actúen de reservorio para el virus (Hedge *et al.*, 2009). En conjunto, la utilización de vacunas contra la fiebre aftosa basadas en viriones termoestables puede producir un beneficio económico y social muy considerable, especialmente en países donde esta enfermedad es enzoótica.

Nuestros estudios sobre termoestabilización de VFA mediante métodos genéticos para el desarrollo de nuevas vacunas menos dependientes de una cadena de frío se iniciaron hace varios años (Mateo *et al.*, 2003, 2008) y se han continuado y ampliado grandemente en esta tesis. Hedge *et al.* (2009) ha hecho una referencia detallada a la importancia práctica de nuestros resultados (publicados para los variantes A2065H y D3069E/T2188A; Mateo *et al.*, 2008). Más recientemente, en el último informe (2011) del consorcio *Global Foot and Mouth Disease Research Alliance*, del que formamos parte, otros grupos expertos en fiebre aftosa reconocen explícitamente la importancia aplicada de estudios encaminados a la termoestabilización genética de VFA con fines vacunales, y mencionan que ellos han iniciado actualmente este tipo de estudios.

### 5.3.2. Vacunas basadas en cápsidas vacías de suficiente termoestabilidad

Con respecto a las vacunas actuales basadas en viriones inactivados químicamente, las vacunas basadas cápsidas vacías presentarían la gran ventaja de evitar la manipulación de material infeccioso, asegurando al mismo tiempo la inmunización eficaz del animal por ser antigénicamente indistinguibles del virión (Curry *et al.*, 1995, 1997). Como ya hemos mencionado, se han utilizado varios sistemas de expresión para producir cápsidas vacías de VFA. Sin embargo, todos estos métodos han logrado, en los mejores casos, rendimientos muy bajos en comparación a los que se requerirían para la producción de una vacuna a gran escala (Roosien *et al.*, 1990; Lewis *et al.*, 1991; Abrams *et al.*, 1995; Mayr *et al.*, 1999; Li *et al.*, 2008; Cao *et al.*, 2009). Adicionalmente, se ha aportado evidencia que indica



que las cápsidas vacías son aún menos estables que los viriones, a causa de la ausencia del ARN (Curry *et al.*, 1997); esta observación puede explicar la baja inmunogenicidad obtenida en los escasos ensayos realizados con cápsidas vacías de VFA.

Los resultados que hemos obtenido demuestran que mutaciones como A2065H y D3069E/T2188A que estabilizan el virión, estabilizan también la cápsida vacía de VFA. Además, hemos obtenido directamente cápsidas vacías variantes (en especial N2019H y H3141A/N2019H) que, en experimentos iniciales, revelan ser mucho más estables frente a la disociación térmica que la cápsida parental (C-S8c1). Estos resultados muy prometedores indican que, caso que se puedan resolver los problemas de baja expresión de cápsidas vacías de VFA, se podrían utilizar cápsidas como las que hemos obtenido en este trabajo para desarrollar una nueva vacuna mejorada para VFA, carente de riesgos de infección y, sin embargo, adecuadamente inmunogénica y termoestable.

### **5.4. Comparación de las diferentes interfases entre las subunidades de la cápsida de VFA**

Nuestro análisis mutacional de las interfases entre protómeros dentro de un mismo pentámero en la cápsida de VFA revela diferencias funcionales muy importantes con las interfases entre pentámeros, analizadas previamente por nuestro grupo (Mateo *et al.*, 2003). Estas diferencias pueden, en buena parte, constituir un reflejo de las diferencias estructurales y de la participación de los dos tipos de interfases en diferentes etapas del proceso de ensamblaje de la cápsida.

La interfase entre pentámeros está, en su gran mayoría, compuesta por residuos polares y constituye una interfase proteína-proteína atípica. Algunas otras interfases entre subunidades en la cápsida de otros virus presentan igualmente una naturaleza esencialmente polar. Un ejemplo destacable son las interfases NTD-NTD y NTD-CTD en la cápsida madura de VIH-1. Estas interfases presentan una afinidad de asociación extraordinariamente baja. La relativa facilidad de disociación de los pentámeros en la cápsida de VFA indica que la afinidad entre ellos es, igualmente, baja. En esta situación de muy baja afinidad, es razonable esperar que la mutación de cualquier residuo implicado en interacciones entre pentámeros, incluso si éstas son relativamente débiles, pueda por sí sola

impedir el ensamblaje entre pentámeros o facilitar su disociación. Esta posibilidad es consistente con los resultados obtenidos en nuestro grupo mediante *alanine scanning* exhaustivo de estas interfases. Estos resultados demostraron que la mayor parte de los residuos en las mismas son individualmente necesarias para la infectividad del virión, posiblemente debido, al menos en parte, a su papel en el ensamblaje y/o el mantenimiento de la integridad de la cápsida (Mateo *et al.*, 2003; Mateo, 2004). La posibilidad de analizar los efectos de estas mutaciones, incluso las letales, en el ensamblaje y estabilidad la cápsida vacía, gracias a parte del trabajo realizado en esta tesis, permitirá confirmar este último punto.

En marcado contraste con la interfase entre pentámeros, la interfase entre protómeros del mismo pentámero implica (por protómero) el doble de residuos que la primera. Además, la interfase entre protómeros presenta una parte interna formada esencialmente por residuos hidrofóbicos, que constituyen más del 50% de los residuos interfásicos. En este aspecto, aunque muy alargada debido a la arquitectura de la cápsida, esta interfase se asemeja a muchas interfases proteína-proteína en oligómeros celulares. La presencia de un “núcleo” hidrofóbico en la interfase entre protómeros que forman un pentámero y la gran estabilidad relativa de estos indican una afinidad de asociación entre protómeros muy superior a la afinidad de asociación entre pentámeros. Estas observaciones son igualmente consistentes con el mecanismo propuesto para el ensamblaje jerárquico de la cápsida de picornavirus.

La disección molecular mediante *alanine scanning* de las interfases entre protómeros del mismo pentámero realizada en esta tesis incluyó la gran mayoría de los residuos implicados en interacciones que presumiblemente pueden tener una contribución relativamente importante a la asociación. A pesar de ello, únicamente la eliminación de aproximadamente un 20% de las cadenas laterales analizadas redujo drásticamente la infectividad del virión. Por tanto, sólo este 20% de estas cadenas laterales, o menos, tiene un papel individualmente importante para el ensamblaje del virión, o cualquier otra etapa del ciclo vírico. Además, no se encontró ninguna correlación entre la fuerza presumible de las interacciones en que una cadena lateral en estas interfases está implicada, y la reducción de la infectividad. Finalmente, la mayoría de las escasas mutaciones que redujeron fuertemente la infectividad impidieron la formación de protómeros no procesados. Por tanto, su efecto no se debe, probablemente, a la inhibición del ensamblaje

de los protómeros en pentámeros ni tampoco a la maduración de los protómeros, sino a un defecto en una etapa anterior del ciclo vírico.

En los experimentos que revelaron que estos mutantes no llegan a formar protómeros no procesados el análisis se realizó a un tiempo suficientemente largo como para que hubiera reinfección. Tenemos previsto realizar este análisis a tiempos más cortos en el que esencialmente no haya tiempo a que ocurran reinfecciones. Puesto que el análisis se realiza mediante transfección, en caso de obtener en estos nuevos experimentos el mismo resultado (ausencia de protómeros inmaduros) se podría descartar que el efecto observado se deba a un problema en el reconocimiento del receptor, la entrada del virus en la célula, o el proceso de desencapsidación. En tal caso, todo apuntaría a que estas mutaciones podrían dificultar el plegamiento del protómero no procesado.

Sea cual sea el caso, los resultados indican que en las interfases entre protómeros del mismo pentámero no hay esencialmente ningún residuo individualmente crítico para el ensamblaje del pentámero. Es decir, no existen “hot spots” energéticos en estas interfases. Por lo tanto, desde el punto de vista del ensamblaje de la cápsida, las interfases entre protómeros serían extremadamente tolerantes a la mutación. Esto no significa que ninguno de los residuos en estas interfases esté conservado. En efecto, aunque no estén implicados en el ensamblaje de los pentámeros, es un hecho que un 20% de estos residuos son críticos para la infectividad. Como cabría esperar, estos residuos están mucho más conservados en VFA que los residuos de las mismas interfases cuya mutación reduce sólo ligeramente o retrasa, o no tiene ningún efecto en absoluto, sobre la infectividad.

### **5.5. La aglomeración macromolecular reduce la actividad de agentes antivirales**

En la parte final de esta tesis evaluamos experimentalmente una predicción de la teoría de aglomeración molecular, según la cual la capacidad inhibitoria de moléculas relativamente pequeñas sobre reacciones de asociación macromolecular se vería reducida en un entorno aglomerado como son los fluidos fisiológicos intra y extracelulares.

El sistema que utilizamos para verificar o desmentir experimentalmente esa predicción se basó en la inhibición de la asociación entre VFA y su receptor en la membrana de células hospedadoras por una pequeño péptido sintético. Se eligió al Ficoll-70 como agente de aglomeración debido a su baja viscosidad, su tamaño comparable al de muchas proteínas, y su baja tendencia a interactuar específicamente con otros solutos, como las proteínas (Fodeke *et al.*, 2010). Las concentraciones de Ficoll-70 utilizadas mimetizan *in vitro* el entorno aglomerado que origina una mezcla heterogénea de proteínas en los líquidos intercelulares de algunos tejidos donde ocurre el reconocimiento entre células hospedadoras y VFA. El uso de un único agente de aglomeración inerte excluye las complicaciones debidas a efectos adicionales que podrían darse si se utilizarán mezclas complejas de macromoléculas, permitiendo asignar a los efectos observados de exclusión de volumen exclusivamente a este agente (Ando y Skolnick, 2010).

La teoría de exclusión de volumen proporciona un marco conceptual simplificado que puede resultar adecuado para el sistema experimental que hemos utilizado. Este marco conceptual fue desarrollado por Minton (1993), presentado con un ejemplo teórico (I en el artículo citado), y se resume a continuación adaptado a nuestro sistema:

Si M (virión de VFA, peso molecular elevado, alrededor de  $8 \times 10^6$  Da) se une a T (integrina) con una constante aparente de asociación en el equilibrio  $K_{MT}$ , y si I (péptido, peso molecular bajo, alrededor de 2000 Da) se une a T con una constante aparente de asociación de equilibrio  $K_{IT}$ , las relaciones entre  $K_{MT}$  o  $K_{IT}$  y las constantes verdaderas de equilibrio de asociación correspondientes  $K_{MT}^0$  o  $K_{IT}^0$  son:

$$K_{MT} = K_{MT}^0 \gamma_M,$$

$$K_{IT} = K_{IT}^0 \gamma_I,$$

donde  $\gamma_M$  y  $\gamma_I$  son los coeficientes de actividad termodinámica (química) de M e I, respectivamente. Entonces, la relación entre la preferencia (P) de T por M res

pecto a I será:

$$K_{MT}/K_{IT} = (K_{MT}^0 \gamma_M) / (K_{IT}^0 \gamma_I) = P_0 (\gamma_M / \gamma_I),$$

Donde  $P_0$  es la preferencia de T por M relativa a I, en una solución diluida (ideal, en ausencia de agente de aglomeración), en la cual  $\gamma_M = \gamma_I = 1$ . En presencia de una elevada

concentración de una especie inerte C (actuando como agente de aglomeración, Ficoll en nuestro caso), el valor del coeficiente de actividad  $\gamma_X$ , dependerá, en parte, del tamaño del reactivo X respecto al tamaño de C. Cabe anotar que, el Ficoll es mayor que los inhibidores I utilizados. Además, si I es menor que M (como es nuestro caso de estudio),  $\gamma_M$  aumentará más deprisa que  $\gamma_I$  con la concentración de C, porque el volumen disponible en esas condiciones es menor para M que para I. Entonces  $\gamma_M/\gamma_I$  será mayor que 1, y el valor de  $P$  mayor que  $P_0$ , es decir, en un entorno aglomerado será mayor la preferencia de T por M que por I.

De acuerdo con esta predicción teórica, muy recientemente se ha demostrado que pequeños ligandos químicos que se unen al ADN en su estructura cuádruple-G, y que de este modo inhiben la actividad de la telomerasa, son menos efectivos en condiciones de aglomeración macromolecular (Chen *et al.*, 2009). Sin embargo, en nuestro conocimiento, hasta el momento no se había probado en ningún otro sistema celular o viral la predicción de que la aglomeración macromolecular presente en condiciones fisiológicas podría disminuir la actividad inhibitoria de pequeños compuestos. El principal resultado que obtuvimos en nuestro sistema VFA- receptor celular- péptido inhibidor es que, en determinadas condiciones experimentales, la aglomeración macromolecular reduce significativamente, como predice la teoría, la actividad inhibitoria del péptido antiviral. Sin embargo, este efecto ocurrió en presencia de una relación virus:receptor (V/R) celular elevada, pero no en una relación más baja.

El análisis teórico anterior no proporciona una explicación para entender el por qué el efecto de aglomeración molecular sobre la actividad del péptido antiviral desaparece a la relación virus:receptor menor. Nosotros sugerimos que esto podría deberse a la presencia de un efecto adicional no identificado que compense el efecto de la aglomeración. El sistema que hemos utilizado es más complejo que el utilizado para el análisis teórico. Por ejemplo, el virus, a diferencia del péptido, podría interactuar con otras moléculas receptoras, o su internalización en la célula puede depender del número de receptores unidos al virus, que dependerán de la relación V/R. VFA se une a diferentes receptores con elevada afinidad, cosa que podría no ocurrir en el caso del péptido; podrían ocurrir diferentes reacciones de competición entre virus y péptido, no una sola, tal vez dependiendo de la relación V/R. Además, una colisión improductiva con los receptores podría alterar conformacionalmente las partículas virales y su infectividad; la frecuencia de

la colisión dependería de la relación V/R. Finalmente, los receptores están fijos en la membrana celular y no en solución (para un ejemplo de las predicciones de la teoría de aglomeración macromolecular en reacciones de asociación a las membranas celulares, ver Kim y Yethiraj (2010)). Debido a estas u otras razones, algunas de las simplificaciones teóricas realizadas podrían tener que revisarse en su aplicación a este sistema más complicado. Sin embargo, es importante resaltar que la reducción teórica prevista en la actividad inhibitoria de los péptidos en un entorno aglomerado ocurrió de hecho, aunque en este sistema fuera en forma dependiente de las condiciones.

En vista de estos resultados, y para confirmar de modo más sólido y general esta predicción de la teoría de aglomeración molecular, Rebeca Bocanegra en nuestro laboratorio ha utilizado un sistema modelo completamente diferente. Este segundo sistema contempla la inhibición del ensamblaje *in vitro* de la cápsida madura de VIH-1 por un péptido antiviral. Los resultados mostraron claramente que la presencia de aglomeración macromolecular reduce considerablemente la actividad inhibidora de este péptido sobre el ensamblaje de la cápsida de VIH-1 (Bocanegra, 2011; Rincón *et al.*, 2011), como predice la teoría de aglomeración macromolecular.

Los resultados obtenidos podrían tener implicaciones prácticas en la búsqueda inicial de moléculas pequeñas dirigidas a inhibir el reconocimiento del virus por su receptor celular. La actividad inhibitoria de los candidatos antivirales *in vivo* podría ser menor que la esperada basándose en las evaluaciones iniciales llevadas a cabo en solución diluida *in vitro* o en cultivos de células *ex vivo*. Por ejemplo, en los experimentos *ex vivo* dirigidos a evaluar la inhibición del reconocimiento del virus por la células huésped, la concentración de proteína total en el medio de cultivo celular, aún si está suplementado con un 5-10% de SFB, podría ser de ~1 mg/ml o incluso menor, correspondiendo esencialmente a condiciones diluidas (de Rizzo *et al.*, 1984). Estas concentraciones son aproximadamente de dos ordenes de magnitud inferiores a las que producen los efectos asociados a un entorno aglomerado *in vivo*. La adición de una elevada concentración de algún tipo de agente molecular en ensayos de cribado *in vivo* o *ex vivo* de candidatos antivirales potenciales podría contribuir a una mejor evaluación inicial de su actividad en condiciones de concentración macromolecular más similares a las que se encontrarán *in vivo*



## **CONCLUSIONES**





## 6. CONCLUSIONES

1. Confirmamos que los viriones variantes D3069E/T2188A y A2065H de VFA son sustancialmente más estables frente a la disociación térmica que el virión parental. Estos viriones presentan cinéticas de producción similares y son antigénicamente indistinguibles del parental, tanto en su forma infecciosa como tras su inactivación con BEI. Estas y otras observaciones sugieren que estos variantes son buenos candidatos para el desarrollo de vacunas termoestables contra la fiebre aftosa.
2. En el virión de VFA existen repulsiones coulombianas entre pentámeros incluso a pH neutro, en las que participan, al menos, los carboxilatos de D2068, E2086, D3134 y D3195.
3. La mutación A2065H estabiliza el virión de VFA actúa muy probablemente porque la carga positiva introducida neutraliza en parte alguna(s) de las cargas negativas causantes de la repulsión entre pentámeros.
4. El descubrimiento de la repulsión electrostática entre pentámeros en el virión de VFA a pH neutro ha permitido obtener mediante un abordaje enteramente racional basado en la ingeniería de proteínas cuatro nuevos variantes de VFA (D2068N, E2086Q, D3134N y D3195N) que presentan una mayor termoestabilidad frente a la disociación en subunidades. Estos variantes resultan candidatos adicionales para el desarrollo de vacunas termoestables contra la fiebre aftosa.
5. Utilizando como ejemplo los variantes A2065H y D3069E/T2188A, se ha comprobado que mutaciones en la cápsida que estabilizan el virión de VFA estabilizan del mismo modo la cápsida vacía recombinante. Estos resultados resultan de interés para el desarrollo de nuevas vacunas contra la fiebre aftosa basadas en cápsidas vacías.
6. En experimentos iniciales se ha observado que la mutación letal H3141A en la interfase entre pentámeros en la cápsida VFA interfiere con el correcto ensamblaje de la cápsida. La mutación secundaria compensatoria N2019H, fijada en poblaciones de VFA en respuesta a la mutación letal H3141A, restaura el ensamblaje normal de la cápsida. Las cápsidas vacías H3141A y, especialmente, N2019H y H3141A/N2019H son notoriamente más estables frente a la disociación que la cápsida parental,

constituyendo candidatos adicionales para el desarrollo de vacunas termoestables contra la fiebre aftosa.

7. La disección molecular en las interfases entre las subunidades protoméricas que forman los pentámeros en el virión de VFA demuestra que, individualmente, la gran mayoría de las interacciones en la cápsida de VFA entre residuos pertenecientes a protómeros vecinos, son prescindibles durante el ensamblaje de la cápsida de VFA. Su eliminación no afectó sustancialmente a la infectividad del virus.
8. La actividad inhibitoria de una molécula pequeña (un péptido sintético) sobre un proceso de reconocimiento macromolecular (la interacción VFA-receptor celular) se reduce de modo significativo en un entorno macromolecularmente aglomerado, como había predicho un modelo teórico. Esta observación presenta consecuencias para el entendimiento de procesos de reconocimiento molecular en entornos fisiológicos y para el diseño de antivirales.

## **BIBLIOGRAFIA**



## 7. BIBLIOGRAFÍA

**Aarthi, D., K. Ananda Rao, R. Robinson, y V. A. Srinivasan.** 2004. Validation of binary ethyleneimine (BEI) used as an inactivant for foot and mouth disease tissue culture vaccine. *Biologicals* **32**:153-6.

**Abrams, C. C., A. M. King, y G. J. Belsham.** 1995. Assembly of foot-and-mouth disease virus empty capsids synthesized by a vaccinia virus expression system. *J Gen Virol* **76 ( Pt 12)**:3089-98.

**Acharya, R., E. Fry, D. Stuart, G. Fox, D. Rowlands, y F. Brown.** 1989. The three-dimensional structure of foot-and-mouth disease virus at 2.9 Å resolution. *Nature* **337**:709-16.

**Agbandje-McKenna, y M., R. McKenna.** 2011. *Structural Virology*. Royal Society of Chemistry. RSC biomolecular sciences. Cambridge.

**Airaksinen, A., M. Roivainen, y T. Hovi.** 2001. Coxsackievirus A9 VP1 mutants with enhanced or hindered A particle formation and decreased infectivity. *J Virol* **75**:952-60.

**Amadori, M., S. Barei, M. Melegari, y G. F. Panina.** 1987. Safety and efficacy of foot-and-mouth disease vaccines containing endonuclease-inactivated virions. *Vaccine* **5**:219-22.

**Ando, T., and J. Skolnick.** 2010. Crowding and hydrodynamic interactions likely dominate in vivo macromolecular motion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:18457-62.

**Arnold, E., M. Luo, G. Vriend, M. G. Rossmann, A. C. Palmenberg, G. D. Parks, M. J. Nicklin, y E. Wimmer.** 1987. Implications of the picornavirus capsid structure for polyprotein processing. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:21-5.

**Arzt, J., N. Juleff, Z. Zhang, y L. L. Rodríguez.** 2011. The pathogenesis of foot-and-mouth disease I: viral pathways in cattle. *Transbound Emerg Dis* **58**:291-304.

**Ashcroft, A. E., H. Lago, J. M. Macedo, W. T. Horn, N. J. Stonehouse, y P. G. Stockley.** 2005. Engineering thermal stability in RNA phage capsids via disulphide bonds. *J Nanosci Nanotechnol* **5**:2034-41.

**Bablanian, G. M., y M. J. Grubman.** 1993. Characterization of the foot-and-mouth disease virus 3C protease expressed in *Escherichia coli*. *Virology* **197**:320-7.

**Bachrach, H. L., y G. F. Vande Woude.** 1968. Amino acid composition and C-terminal sequence of foot-and-mouth disease virus protein. *Virology* **34**:282-9.

**Bachrach, U.** 1977. Induction of S-adenosyl-L-methionine decarboxylase in glioma and neuroblastoma cells. *FEBS Lett* **75**:201-4.

**Balamurugan, V., R. Renji, G. Venkatesh, G. R. Reddy, S. P. Nair, K. Ganesh, y V. V. Suryanarayana.** 2005. Protective immune response against foot-and-mouth disease virus challenge in guinea pigs vaccinated with recombinant P1 polyprotein expressed in *Pichia pastoris*. *Arch Virol* **150**:967-79.

**Bancroft, J. B.** 1970. The self-assembly of spherical plant viruses. *Adv Virus Res* **16**:99-134.

- Baranowski, E., C. M. Ruiz-Jarabo, N. Sevilla, D. Andreu, E. Beck, y E. Domingo.** 2000. Cell recognition by foot-and-mouth disease virus that lacks the RGD integrin-binding motif: flexibility in aphthovirus receptor usage. *J Virol* **74**:1641-7.
- Baranowski, E., N. Sevilla, N. Verdaguier, C. M. Ruiz-Jarabo, E. Beck, y E. Domingo.** 1998. Multiple virulence determinants of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **72**:6362-72.
- Barteling, S. J., y R. Woortmeyer.** 1987. Multiple variants in foot-and-mouth disease virus (FMDV) populations: the Achilles heel for peptide and rec. DNA vaccines?. *Dev Biol Stand* **66**:511-21.
- Baxt, B.** 1987. Effect of lysosomotropic compounds on early events in foot-and-mouth disease virus replication. *Virus Res* **7**:257-71.
- Baxt, B., y H. L. Bachrach.** 1980. Early interactions of foot-and-mouth disease virus with cultured cells. *Virology* **104**:42-55.
- Baxt, B., y P. W. Mason.** 1995. Foot-and-mouth disease virus undergoes restricted replication in macrophage cell cultures following Fc receptor-mediated adsorption. *Virology* **207**:503-9.
- Beck, E., y K. Strohmaier.** 1987. Subtyping of European foot-and-mouth disease virus strains by nucleotide sequence determination. *J Virol* **61**:1621-9.
- Belsham, G. J.** 1993. Distinctive features of foot-and-mouth disease virus, a member of the picornavirus family; aspects of virus protein synthesis, protein processing and structure. *Prog Biophys Mol Biol* **60**:241-60.
- Belsham, G. J., C. C. Abrams, A. M. King, J. Roosien, y J. M. Vlak.** 1991. Myristoylation of foot-and-mouth disease virus capsid protein precursors is independent of other viral proteins and occurs in both mammalian and insect cells. *J Gen Virol* **72 (Pt 3)**:747-51.
- Belsham, G. J., G. M. McInerney, y N. Ross-Smith.** 2000. Foot-and-mouth disease virus 3C protease induces cleavage of translation initiation factors eIF4A and eIF4G within infected cells. *J Virol* **74**:272-80.
- Bendahmane, M., J. H. Fitch, G. Zhang, y R. N. Beachy.** 1997. Studies of coat protein-mediated resistance to tobacco mosaic tobamovirus: correlation between assembly of mutant coat proteins and resistance. *J Virol* **71**:7942-50.
- Benedetto, S., R. Pulito, S. G. Crichton, G. Tarone, S. Aime, L. Silengo, y J. Hamm.** 2006. Quantification of the expression level of integrin receptor  $\alpha(v)\beta 3$  in cell lines and MR imaging with antibody-coated iron oxide particles. *Magn Reson Med* **56**:711-6.
- Bergelson, J. M.** 2008. New (fluorescent) light on poliovirus entry. *Trends Microbiol* **16**:44-7.
- Berinstein, A., C. Tami, O. Taboga, E. Smitsaart, y E. Carrillo.** 2000. Protective immunity against foot-and-mouth disease virus induced by a recombinant vaccinia virus. *Vaccine* **18**:2231-8.
- Berryman, S., S. Clark, P. Monaghan, y T. Jackson.** 2005. Early events in integrin  $\alpha v\beta 6$ -mediated cell entry of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **79**:8519-34.
- Bocanegra, R., M. Nevot, R. Domenech, I. López, O. Abian, A. Rodríguez-Huete, C. N.**

- Cavasotto, A. Velázquez-Campoy, J. Gómez, M. A. Martínez, J. L. Neira, y M. G. Mateu.** 2011. Rationally designed interfacial peptides are efficient in vitro inhibitors of HIV-1 capsid assembly with antiviral activity. *PLoS One* **6**:e23877.
- Boeckle, S., y E. Wagner.** 2006. Optimizing targeted gene delivery: chemical modification of viral vectors and synthesis of artificial virus vector systems. *AAPS J* **8**:E731-42.
- Bolstad, M., F. Abaitua, C. M. Crump, y P. O'Hare.** 2011. Autocatalytic activity of the ubiquitin-specific protease domain of herpes simplex virus 1 VP1-2. *J Virol* **85**:8738-51.
- Brooksby, J. B.** 1982. Portraits of viruses: foot-and-mouth disease virus. *Intervirology* **18**:1-23.
- Bothner B y J.H. Hilmer.** 2011. Probing Viral Capsids in Solution. En: Agbandje-McKenna y M., R. McKenna (Eds.), *Structural Virology*, pp. 41-61. Royal Society of Chemistry. RSC biomolecular sciences. Cambridge.
- Brown, C. C., M. E. Piccone, P. W. Mason, T. S. McKenna, y M. J. Grubman.** 1996. Pathogenesis of wild-type and leaderless foot-and-mouth disease virus in cattle. *J Virol* **70**:5638-41.
- Brown, F.** 1972. Structure-function relationships in foot-and-mouth disease virus. *Adv Exp Med Biol* **31**:19-28.
- Brown, F., y B. Cartwright.** 1961. Dissociation of foot-and-mouth disease virus into its nucleic acid and protein components. *Nature* **192**:1163-4.
- Burrows, R.** 1966. Studies on the carrier state of cattle exposed to foot-and-mouth disease virus. *J Hyg (Lond)* **64**:81-90.
- Caciagli, P., V. Medina Piles, D. Marian, M. Vecchiati, V. Masenga, G. Mason, T. Falcioni, y E. Noris.** 2009. Virion stability is important for the circulative transmission of tomato yellow leaf curl sardinia virus by *Bemisia tabaci*, but virion access to salivary glands does not guarantee transmissibility. *J Virol* **83**:5784-95.
- Caldeira, J. C., and D. S. Peabody.** 2007. Stability and assembly in vitro of bacteriophage PP7 virus-like particles. *J Nanobiotechnology* **5**:10.
- Cao, Y., Z. Lu, J. Sun, X. Bai, P. Sun, H. Bao, Y. Chen, J. Guo, D. Li, X. Liu, y Z. Liu.** 2009. Synthesis of empty capsid-like particles of Asia I foot-and-mouth disease virus in insect cells and their immunogenicity in guinea pigs. *Vet Microbiol* **137**:10-7.
- Cao, Y., L. Qin, L. Zhang, J. Safrit, y D. D. Ho.** 1995. Virologic and immunologic characterization of long-term survivors of human immunodeficiency virus type 1 infection. *N Engl J Med* **332**:201-8.
- Cao, Y., P. Sun, Y. Fu, X. Bai, F. Tian, X. Liu, Z. Lu, y Z. Liu.** 2010. Formation of virus-like particles from O-type foot-and-mouth disease virus in insect cells using codon-optimized synthetic genes. *Biotechnol Lett* **32**:1223-9.
- Carrasco, C., A. Carreira, I. A. Schaap, P. A. Serena, J. Gomez-Herrero, M. G. Mateu, y P. J. de Pablo.** 2006. DNA-mediated anisotropic mechanical reinforcement of a virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**:13706-11.



- Carrasco, C., M. Castellanos, P. J. de Pablo, y M. G. Mateu.** 2008. Manipulation of the mechanical properties of a virus by protein engineering. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:4150-5.
- Carreira, A., y M. G. Mateu.** 2006. Structural tolerance versus functional intolerance to mutation of hydrophobic core residues surrounding cavities in a parvovirus capsid. *J Mol Biol* **360**:1081-93.
- Carreira, A., M. Menendez, J. Reguera, J. M. Almendral, y M. G. Mateu.** 2004. In vitro disassembly of a parvovirus capsid and effect on capsid stability of heterologous peptide insertions in surface loops. *J Biol Chem* **279**:6517-25.
- Carrillo, E. C., C. Giachetti, y R. Campos.** 1985. Early steps in FMDV replication: further analysis on the effects of chloroquine. *Virology* **147**:118-25.
- Carrillo, E. C., C. Giachetti, y R. H. Campos.** 1984. Effect of lysosomotropic agents on the foot-and-mouth disease virus replication. *Virology* **135**:542-5.
- Carrillo-Tripp, M., C. M. Shepherd, I. A. Borelli, S. Venkataraman, G. Lander, P. Natarajan, J. E. Johnson, C. L. Brooks, 3rd, y V. S. Reddy.** 2009. VIPERdb2: an enhanced and web API enabled relational database for structural virology. *Nucleic Acids Res* **37**:D436-42.
- Caspar, D. L.** 1963. Assembly and Stability of the Tobacco Mosaic Virus Particle. *Adv Protein Chem* **18**:37-121.
- Cartwright, B.** 1962. A study of the antibodies in guinea pigs infected with foot-and-mouth disease virus. *J Immunol* **88**:128-33.
- Cartwright, B., W. G. Chapman, y F. Brown.** 1980. Serological and immunological relations between the 146S and 12S particles of foot-and-mouth disease virus. *J Gen Virol* **50**:369-75.
- Castellanos, M.** 2011. Análisis mutacional de propiedades estructurales y mecánicas del virus diminuto del ratón, y de sus implicaciones biológicas. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.
- Castellanos, M. R. Pérez, J.P. Carrillo, P.J. de Pablo, M.G. Mateu.** 2012. Mechanical disassembly of single virus particles reveals kinetic intermediates predicted by theory. *Biophys J*. En prensa. doi:10.1016/j.bpj.2012.004.06.
- Chen, Z., K. W. Zheng, Y. H. Hao, y Z. Tan.** 2009. Reduced or diminished stabilization of the telomere G-quadruplex and inhibition of telomerase by small chemical ligands under molecular crowding condition. *J Am Chem Soc* **131**:10430-8.
- Chernaia, M. M., B. A. Malcolm, M. Allaire, y M. N. James.** 1993. Hepatitis A virus 3C proteinase: some properties, crystallization and preliminary crystallographic characterization. *J Mol Biol* **234**:890-3.
- Chinsangaram, J., M. E. Piccone, y M. J. Grubman.** 1999. Ability of foot-and-mouth disease virus to form plaques in cell culture is associated with suppression of alpha/beta interferon. *J Virol* **73**:9891-8.
- Chiu, W., R. M. Burnett, y R. L. Garcea.** 1997. Structural biology of viruses. Oxford University Press, New Cork.
- Correa Melo, E., V. Saraiva, y V. Astudillo.** 2002. Review of the status of foot and mouth

disease in countries of South America and approaches to control and eradication. *Rev Sci Tech* **21**:429-36.

**Cortines, J. R., P. R. Weigele, E. B. Gilcrease, S. R. Casjens, y C. M. Teschke.** 2011. Decoding bacteriophage P22 assembly: identification of two charged residues in scaffolding protein responsible for coat protein interaction. *Virology* **421**:1-11.

**Culver, J. N., W. O. Dawson, K. Plonk, y G. Stubbs.** 1995. Site-directed mutagenesis confirms the involvement of carboxylate groups in the disassembly of tobacco mosaic virus. *Virology* **206**:724-30.

**Curry, S., C. C. Abrams, E. Fry, J. C. Crowther, G. J. Belsham, D. I. Stuart, y A. M. King.** 1995. Viral RNA modulates the acid sensitivity of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Virol* **69**:430-8.

**Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman, D. Rowlands, y D. Stuart.** 1996. Perturbations in the surface structure of A22 Iraq foot-and-mouth disease virus accompanying coupled changes in host cell specificity and antigenicity. *Structure* **4**:135-45.

**Curry, S., E. Fry, W. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, T. Jackson, A. King, S. Lea, J. Newman, y D. Stuart.** 1997. Dissecting the roles of VP0 cleavage and RNA packaging in picornavirus capsid stabilization: the structure of empty capsids of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **71**:9743-52.

**Danthi, P., M. Tosteson, Q. H. Li, y M. Chow.** 2003. Genome delivery and ion channel properties are altered in VP4 mutants of poliovirus. *J Virol* **77**:5266-74.

**Datta, S. A., L. G. Temeselew, R. M. Crist, F. Soheilian, A. Kamata, J. Mirro, D. Harvin, K. Nagashima, R. E. Cachau, y A. Rein.** 2011. On the role of the SP1 domain in HIV-1 particle assembly: a molecular switch? *J Virol* **85**:4111-21.

**Davis, M. P., G. Bottley, L. P. Beales, R. A. Killington, D. J. Rowlands, y T. J. Tuthill.** 2008. Recombinant VP4 of human rhinovirus induces permeability in model membranes. *J Virol* **82**:4169-74.

**De Clercq, E.** 2004. Antivirals and antiviral strategies. *Nat Rev Microbiol* **2**:704-20.

**de Felipe, P., L. E. Hughes, M. D. Ryan, y J. D. Brown.** 2003. Co-translational, intraribosomal cleavage of polypeptides by the foot-and-mouth disease virus 2A peptide. *J Biol Chem* **278**:11441-8.

**de Felipe, P., y M. D. Ryan.** 2004. Targeting of proteins derived from self-processing polypeptides containing multiple signal sequences. *Traffic* **5**:616-26.

**de Los Santos, T., S. de Avila Botton, R. Weiblen, y M. J. Grubman.** 2006. The leader proteinase of foot-and-mouth disease virus inhibits the induction of beta interferon mRNA and blocks the host innate immune response. *J Virol* **80**:1906-14.

**de Los Santos, T., F. Diaz-San Segundo, y M. J. Grubman.** 2007. Degradation of nuclear factor kappa B during foot-and-mouth disease virus infection. *J Virol* **81**:12803-15.

**de los Santos, T., F. D. Segundo, J. Zhu, M. Koster, C. C. Dias, y M. J. Grubman.** 2009. A

conserved domain in the leader proteinase of foot-and-mouth disease virus is required for proper subcellular localization and function. *J Virol* **83**:1800-10.

**de la Torre, J. C., E. Martínez-Salas, J. Diez, A. Villaverde, F. Gebauer, E. Rocha, M. Davila, and E. Domingo.** 1988. Coevolution of cells and viruses in a persistent infection of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *J Virol* **62**:2050-8.

**de Rizzo, E., C. A. Vaz, I. F. Mendes, y A. F. Yano.** 1984. Study on the growth promoting capacity of calf and fetal bovine serum for animal cells "in vitro". II. Electrophoretic study and survey on the antiproteolytic activity of pools of calf and fetal bovine serum. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* **26**:97-104.

**del Álamo, M., y M. G. Mateu.** 2005. Electrostatic repulsion, compensatory mutations, and long-range non-additive effects at the dimerization interface of the HIV capsid protein. *J Mol Biol* **345**:893-906.

**del Álamo, M., J. L. Neira, y M. G. Mateu.** 2003. Thermodynamic dissection of a low affinity protein-protein interface involved in human immunodeficiency virus assembly. *J Biol Chem* **278**:27923-9.

**del Álamo, M., G. Rivas, y M. G. Mateu.** 2005. Effect of macromolecular crowding agents on human immunodeficiency virus type 1 capsid protein assembly in vitro. *J Virol* **79**:14271-81.

**Devaney, M. A., V. N. Vakharia, R. E. Lloyd, E. Ehrenfeld, y M. J. Grubman.** 1988. Leader protein of foot-and-mouth disease virus is required for cleavage of the p220 component of the capsid-binding protein complex. *J Virol* **62**:4407-9.

**Dierkes, L. E., C. L. Peebles, B. A. Firek, R. W. Hendrix, y R. L. Duda.** 2009. Mutational analysis of a conserved glutamic acid required for self-catalyzed cross-linking of bacteriophage HK97 capsids. *J Virol* **83**:2088-98.

**Doedens, J. R., y K. Kirkegaard.** 1995. Inhibition of cellular protein secretion by poliovirus proteins 2B and 3A. *EMBO J* **14**:894-907.

**Doel, T. R.** 2003. FMD vaccines. *Virus Res* **91**:81-99.

**Domingo, E., M. Dávila, y J. Ortín.** 1980. Nucleotide sequence heterogeneity of the RNA from a natural population of foot-and-mouth-disease virus. *Gene* **11**:333-46.

**Domingo, E., M.G. Mateu, M.A. Martínez, J. Dopazo, A. Moya, y F. Sobrino.** 1990. Genetic variability and antigenic diversity of foot-and-mouth disease virus. En: Kurstak, E., R.G. Marusyk, F.A. Murphy, M.H.V. van Regenmortel (Eds.), *Applied Virology Research*, pp.233-266. Plenum Press, New York.

**Domingo, E., y J. J. Holland.** 1992. Complications of RNA heterogeneity for the engineering of virus vaccines and antiviral agents. *Genet Eng (N Y)* **14**:13-31.

**Domsic J y R. McKenna.** 2011. Structural Studies of Viral Proteins – X-ray Crystallography. *Structural Virology*, En: Agbandje-McKenna y M., R. McKenna (Eds.), *Structural Virology*, pp. 121-134. Royal Society of Chemistry. RSC biomolecular sciences. Cambridge.

**Dorval, B. L., M. Chow, y A. M. Klibanov.** 1989. Stabilization of poliovirus against heat inactivation. *Biochem Biophys Res Commun* **159**:1177-83.

- Dorval, B. L., M. Chow, y A. M. Klibanov.** 1990. Lysine and other diamines dramatically stabilize poliovirus against thermoinactivation. *Biotechnol Bioeng* **35**:1051-4.
- Dougherty, W. G., y B. L. Semler.** 1993. Expression of virus-encoded proteinases: functional and structural similarities with cellular enzymes. *Microbiol Rev* **57**:781-822.
- Douglas, C. C., D. Thomas, J. Lanman, y P. E. Prevelige, Jr.** 2004. Investigation of N-terminal domain charged residues on the assembly and stability of HIV-1 CA. *Biochemistry* **43**:10435-41.
- Douglas, T., y M. Young.** 2006. Viruses: making friends with old foes. *Science* **312**:873-5.
- Doyle, J. D., P. Danthi, E. A. Kendall, L. S. Ooms, J. D. Wetzel, y T. S. Dermody.** 2012. Molecular determinants of proteolytic disassembly of the reovirus outer capsid. *J Biol Chem* **287**:8029-38.
- Dubra, M. S., J. L. La Torre, E. A. Scodeller, C. D. Denoya, y C. Vásquez.** 1982. Cores in foot-and-mouth disease virus. *Virology* **116**:349-53.
- Dunn, C. S., y A. I. Donaldson.** 1997. Natural adaption to pigs of a Taiwanese isolate of foot-and-mouth disease virus. *Vet Rec* **141**:174-5.
- Dus Santos, M. J., C. Carrillo, F. Ardila, R. D. Rios, P. Franzone, M. E. Piccone, A. Wigdorovitz, y M. V. Borca.** 2005. Development of transgenic alfalfa plants containing the foot and mouth disease virus structural polyprotein gene P1 and its utilization as an experimental immunogen. *Vaccine* **23**:1838-43.
- Ellard, F. M., J. Drew, W. E. Blakemore, D. I. Stuart, y A. M. King.** 1999. Evidence for the role of His-142 of protein 1C in the acid-induced disassembly of foot-and-mouth disease virus capsids. *J Gen Virol* **80 (Pt 8)**:1911-8.
- Escarmís, C., M. Dávila, N. Charpentier, A. Bracho, A. Moya, y E. Domingo.** 1996. Genetic lesions associated with Muller's ratchet in an RNA virus. *J Mol Biol* **264**:255-67.
- Escarmís, C., M. Dávila, y E. Domingo.** 1999. Multiple molecular pathways for fitness recovery of an RNA virus debilitated by operation of Muller's ratchet. *J Mol Biol* **285**:495-505.
- Escarmís, C., M. Toja, M. Medina, y E. Domingo.** 1992. Modifications of the 5' untranslated region of foot-and-mouth disease virus after prolonged persistence in cell culture. *Virus Res* **26**:113-25.
- Ferguson, N. M., C. A. Donnelly, y R. M. Anderson.** 2001. The foot-and-mouth epidemic in Great Britain: pattern of spread and impact of interventions. *Science* **292**:1155-60.
- Fernández-Miragall, O., S. López de Quinto, y E. Martínez-Salas.** 2009. Relevance of RNA structure for the activity of picornavirus IRES elements. *Virus Res* **139**:172-82.
- Ferrer-Orta, C., A. Arias, C. Escarmís, y N. Verdaguer.** 2006. A comparison of viral RNA-dependent RNA polymerases. *Curr Opin Struct Biol* **16**:27-34.
- Filman, D. J., R. Syed, M. Chow, A. J. Macadam, P. D. Minor, y J. M. Hogle.** 1989. Structural factors that control conformational transitions and serotype specificity in type 3 poliovirus. *EMBO J* **8**:1567-79.

- Flint, S. J., L.W. Enquist, R.M. Krug, V.R. Racaniello, y A.M. Skalka.** 2004. Principles of Virology: molecular biology, pathogenesis, and control of animal viruses. Second edition. ASM Press, Washington D.C.
- Fischlechner, M., y E. Donath.** 2007. Viruses as building blocks for materials and devices. *Angew Chem Int Ed Engl* **46**:3184-93.
- Fodeke, A. A., y A. P. Minton.** 2010. Quantitative characterization of polymer-polymer, protein-protein, and polymer-protein interaction via tracer sedimentation equilibrium. *J Phys Chem B* **114**:10876-80.
- Fox, G., N. R. Parry, P. V. Barnett, B. McGinn, D. J. Rowlands, y F. Brown.** 1989. The cell attachment site on foot-and-mouth disease virus includes the amino acid sequence RGD (arginine-glycine-aspartic acid). *J Gen Virol* **70 ( Pt 3)**:625-37.
- Fracastorius.** 1546. De Cotagion et Contagiosus Morbis et Curatione, Venecia.
- Francki, R. I., y N. Habili.** 1972. Stabilization of capsid structure and enhancement of immunogenicity of cucumber mosaic virus (Q strain) by formaldehyde. *Virology* **48**:309-15.
- Fry, E. E., J. Grimes, y D. I. Stuart.** 1999a. Virus crystallography. *Mol Biotechnol* **12**:13-23.
- Fry, E. E., S. M. Lea, T. Jackson, J. W. Newman, F. M. Ellard, W. E. Blakemore, R. Abu-Ghazaleh, A. Samuel, A. M. King, y D. I. Stuart.** 1999b. The structure and function of a foot-and-mouth disease virus-oligosaccharide receptor complex. *EMBO J* **18**:543-54.
- Fry, E. E., D. I. Stuart, y D. J. Rowlands.** 2005. The structure of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**:71-101.
- Fuchs, R., y D. Blaas.** 2010. Uncoating of human rhinoviruses. *Rev Med Virol* **20**:281-97.
- Gamarnik, A. V., y R. Andino.** 1997. Two functional complexes formed by KH domain containing proteins with the 5' noncoding region of poliovirus RNA. *RNA* **3**:882-92.
- Ganser-Pornillos, B. K., U. K. von Schwedler, K. M. Stray, C. Aiken, y W. I. Sundquist.** 2004. Assembly properties of the human immunodeficiency virus type 1 CA protein. *J Virol* **78**:2545-52.
- Gebauer, F., J. C. de la Torre, I. Gomes, M. G. Mateu, H. Barahona, B. Tiraboschi, I. Bergmann, P. A. de Mello, y E. Domingo.** 1988. Rapid selection of genetic and antigenic variants of foot-and-mouth disease virus during persistence in cattle. *J Virol* **62**:2041-9.
- Giles, J.** 2001. Farmers act to avert foot-and-mouth crisis. *Nature* **410**:4.
- Glaser, W., y T. Skern.** 2000. Extremely efficient cleavage of eIF4G by picornaviral proteinases L and 2A in vitro. *FEBS Lett* **480**:151-5.
- Golmohammadi, R., K. Fridborg, M. Bundule, K. Valegard, y L. Liljas.** 1996. The crystal structure of bacteriophage Q beta at 3.5 Å resolution. *Structure* **4**:543-54.
- Govindasamy, L., M. Agbandje-McKenna, y R. McKenna.** 2011. X-ray Crystallography of Virus Capsids Lakshmanan. En: Agbandje-McKenna y M., R. McKenna (Eds.), *Structural Virology*, pp. 100-120. Royal Society of Chemistry. RSC biomolecular sciences. Cambridge.

**Greene, W. C., Z. Debyser, Y. Ikeda, E. O. Freed, E. Stephens, W. Yonemoto, R. W. Buckheit, J. A. Este, y T. Cihlar.** 2008. Novel targets for HIV therapy. *Antiviral Res* **80**:251-65.

**Gromeier, M., B. Bossert, M. Arita, A. Nomoto, y E. Wimmer.** 1999. Dual stem loops within the poliovirus internal ribosomal entry site control neurovirulence. *J Virol* **73**:958-64.

**Grubman, M. J.** 1984. In vitro morphogenesis of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **49**:760-5.

**Grubman, M. J.** 2005. Development of novel strategies to control foot-and-mouth disease: marker vaccines and antivirals. *Biologicals* **33**:227-34.

**Grubman, M. J., y B. Baxt.** 2004. Foot-and-mouth disease. *Clin Microbiol Rev* **17**:465-93.

**Grubman, M. J., S. A. Lewis, y D. O. Morgan.** 1993. Protection of swine against foot-and-mouth disease with viral capsid proteins expressed in heterologous systems. *Vaccine* **11**:825-9.

**Grubman, M. J., C. Mebus, B. Dale, M. Yamanaka, y T. Yilma.** 1988. Analysis of the polypeptides synthesized in rinderpest virus-infected cells. *Virology* **163**:261-7.

**Grubman, M. J., D. O. Morgan, J. Kendall, y B. Baxt.** 1985. Capsid intermediates assembled in a foot-and-mouth disease virus genome RNA-programmed cell-free translation system and in infected cells. *J Virol* **56**:120-6.

**Guttman, N., y D. Baltimore.** 1977. Morphogenesis of poliovirus. IV. existence of particles sedimenting at 150S and having the properties of provirion. *J Virol* **23**:363-7.

**Hajimorad, M. R., y R. I. Francki.** 1991. Effect of glutaraldehyde-fixation on the immunogenicity, particle stability and antigenic reactivity of alfalfa mosaic virus, and the specificity of elicited antibodies. *J Virol Methods* **33**:13-25.

**Hall, P. R., B. Hjelle, D. C. Brown, C. Ye, V. Bondu-Hawkins, K. A. Kilpatrick, y R. S. Larson.** 2008. Multivalent presentation of antihantavirus peptides on nanoparticles enhances infection blockade. *Antimicrob Agents Chemother* **52**:2079-88.

**Hansen, S. H., K. Sandvig, y B. van Deurs.** 1993. Clathrin and HA2 adaptors: effects of potassium depletion, hypertonic medium, and cytosol acidification. *J Cell Biol* **121**:61-72.

**Hansen, J. L., A. M. Long, y S. C. Schultz.** 1997. Structure of the RNA-dependent RNA polymerase of poliovirus. *Structure* **5**:1109-22.

**Harmsen, M. M., y H. J. De Haard.** 2007. Properties, production, and applications of camelid single-domain antibody fragments. *Appl Microbiol Biotechnol* **77**:13-22.

**Harmsen, M. M., H. P. Fijten, A. Dekker, y P. L. Eble.** 2008. Passive immunization of pigs with bispecific llama single-domain antibody fragments against foot-and-mouth disease and porcine immunoglobulin. *Vet Microbiol* **132**:56-64.

**Harmsen, M. M., H. P. Fijten, D. F. Westra, y J. M. Coco-Martin.** 2011. Effect of thiomersal on dissociation of intact (146S) foot-and-mouth disease virions into 12S particles as assessed by novel ELISAs specific for either 146S or 12S particles. *Vaccine* **29**:2682-90.

**Harmsen, M. M., J. Jansen, D. F. Westra, y J. M. Coco-Martin.** 2010. Characterization of foot-and-mouth disease virus antigen by surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight-



mass spectrometry in aqueous and oil-emulsion formulations. *Vaccine* **28**:3363-70.

**Hegde, N. R., M. S. Maddur, P. P. Rao, S. V. Kaveri, y J. Bayry.** 2009. Thermostable foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate for endemic countries: a perspective. *Vaccine* **27**:2199-201.

**Heuser, J. E., y R. G. Anderson.** 1989. Hypertonic media inhibit receptor-mediated endocytosis by blocking clathrin-coated pit formation. *J Cell Biol* **108**:389-400.

**Hewat, E. A., N. Verdaguer, I. Fita, W. Blakemore, S. Brookes, A. King, J. Newman, E. Domingo, M. G. Mateu, y D. I. Stuart.** 1997. Structure of the complex of an Fab fragment of a neutralizing antibody with foot-and-mouth disease virus: positioning of a highly mobile antigenic loop. *EMBO J* **16**:1492-500.

**Hogle, J. M., M. Chow, y D. J. Filman.** 1985. Three-dimensional structure of poliovirus at 2.9 Å resolution. *Science* **229**:1358-65.

**Holguín, A., J. Hernández, M. A. Martínez, M. G. Mateu, y E. Domingo.** 1997. Differential restrictions on antigenic variation among antigenic sites of foot-and-mouth disease virus in the absence of antibody selection. *J Gen Virol* **78** ( Pt 3):601-9.

**Ismail-Cassim, N., C. Chezzi, y J. F. Newman.** 1990. Inhibition of the uncoating of bovine enterovirus by short chain fatty acids. *J Gen Virol* **71** ( Pt 10):2283-9.

**Jackson, T., F. M. Ellard, R. A. Ghazaleh, S. M. Brookes, W. E. Blakemore, A. H. Corteyn, D. I. Stuart, J. W. Newman, y A. M. King.** 1996. Efficient infection of cells in culture by type O foot-and-mouth disease virus requires binding to cell surface heparan sulfate. *J Virol* **70**:5282-7.

**Jackson, T., A. P. Mould, D. Sheppard, y A. M. King.** 2002. Integrin alphavbeta1 is a receptor for foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **76**:935-41.

**Jacobson, M. F., y D. Baltimore.** 1968. Polypeptide cleavages in the formation of poliovirus proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* **61**:77-84.

**Johns, H. L., S. Berryman, P. Monaghan, G. J. Belsham, y T. Jackson.** 2009. A dominant-negative mutant of rab5 inhibits infection of cells by foot-and-mouth disease virus: implications for virus entry. *J Virol* **83**:6247-56.

**Johnson, H. R., J. M. Hooker, M. B. Francis, y D. S. Clark.** 2007. Solubilization and stabilization of bacteriophage MS2 in organic solvents. *Biotechnol Bioeng* **97**:224-34.

**Johnson, J. E.** 2008. Multi-disciplinary studies of viruses: the role of structure in shaping the questions and answers. *J Struct Biol* **163**:246-53.

**Jones, D. M., A. M. Atoom, X. Zhang, S. Kottitil, y R. S. Russell.** 2011. A genetic interaction between the core and NS3 proteins of hepatitis C virus is essential for production of infectious virus. *J Virol* **85**:12351-61.

**Jones, J. C., E. A. Turpin, H. Bultmann, C. R. Brandt, y S. Schultz-Cherry.** 2006. Inhibition of influenza virus infection by a novel antiviral peptide that targets viral attachment to cells. *J Virol* **80**:11960-7.

**Kawano, M. A., L. Xing, H. Tsukamoto, T. Inoue, H. Handa, y R. H. Cheng.** 2009. Calcium

bridge triggers capsid disassembly in the cell entry process of simian virus 40. *J Biol Chem* **284**:34703-12.

**Kim, J. S., y A. Yethiraj.** 2010. Crowding effects on association reactions at membranes. *Biophys J* **98**:951-8.

**Kirchweger, R., E. Ziegler, B. J. Lamphear, D. Waters, H. D. Liebig, W. Sommergruber, F. Sobrino, C. Hohenadl, D. Blaas, R. E. Rhoads, y *et al.*** 1994. Foot-and-mouth disease virus leader proteinase: purification of the Lb form and determination of its cleavage site on eIF-4 gamma. *J Virol* **68**:5677-84.

**Kitching, P., J. Hammond, M. Jeggo, B. Charleston, D. Paton, L. Rodríguez, y R. Heckert.** 2007. Global FMD control--is it an option? *Vaccine* **25**:5660-4.

**Knipe, T., E. Rieder, B. Baxt, G. Ward, y P. W. Mason.** 1997. Characterization of synthetic foot-and-mouth disease virus provirions separates acid-mediated disassembly from infectivity. *J Virol* **71**:2851-6.

**Knowles, N. J., A. R. Samuel, P. R. Davies, R. J. Midgley, y J. F. Valarcher.** 2005. Pandemic strain of foot-and-mouth disease virus serotype O. *Emerg Infect Dis* **11**:1887-93.

**Lea, S., J. Hernandez, W. Blakemore, E. Brocchi, S. Curry, E. Domingo, E. Fry, R. Abu-Ghazaleh, A. King, J. Newman, y *et al.*** 1994. The structure and antigenicity of a type C foot-and-mouth disease virus. *Structure* **2**:123-39.

**Lee, W. M., S. S. Monroe, y R. R. Rueckert.** 1993. Role of maturation cleavage in infectivity of picornaviruses: activation of an infectious particle. *J Virol* **67**:2110-22.

**Lemay, G., y M. Bisailon.** 2012. Further characterization and determination of the single amino acid change in the tsI138 reovirus thermosensitive mutant. *Can J Microbiol* **58**:589-95.

**Lepère-Douard, C., M. Trotard, J. Le Seyec, y P. Gripon.** 2009. The first transmembrane domain of the hepatitis B virus large envelope protein is crucial for infectivity. *J Virol* **83**:11819-29.

**Leung, J. Y., G. P. Pijlman, N. Kondratieva, J. Hyde, J. M. Mackenzie, y A. A. Khromykh.** 2008. Role of nonstructural protein NS2A in flavivirus assembly. *J Virol* **82**:4731-41.

**Lewis, S. A., D. O. Morgan, y M. J. Grubman.** 1991. Expression, processing, and assembly of foot-and-mouth disease virus capsid structures in heterologous systems: induction of a neutralizing antibody response in guinea pigs. *J Virol* **65**:6572-80.

**Li, M., P. Beard, P. A. Estes, M. K. Lyon, y R. L. Garcea.** 1998. Intercapsomeric disulfide bonds in papillomavirus assembly and disassembly. *J Virol* **72**:2160-7.

**Li, Z., y J. Liu.** 2011. The current state of vaccines used in the field for foot and mouth disease virus in China. *Expert Rev Vaccines* **10**:13-5.

**Li, Z., Y. Yi, X. Yin, Z. Zhang, y J. Liu.** 2008. Expression of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in silkworm-baculovirus expression system and its utilization as a subunit vaccine. *PLoS One* **3**:e2273.

**Lin, J. Y., T. C. Chen, K. F. Weng, S. C. Chang, L. L. Chen, y S. R. Shih.** 2009. Viral and host



proteins involved in picornavirus life cycle. *J Biomed Sci* **16**:103.

**Longjam, N., R. Deb, A. K. Sarmah, T. Tayo, V. B. Awachat, y V. K. Saxena.** 2011. A Brief Review on Diagnosis of Foot-and-Mouth Disease of Livestock: Conventional to Molecular Tools. *Vet Med Int* **2011**:905768.

**López de Quinto, S., M. Sáiz, D. de la Morena, F. Sobrino, y E. Martínez-Salas.** 2002. IRES-driven translation is stimulated separately by the FMDV 3'-NCR and poly(A) sequences. *Nucleic Acids Res* **30**:4398-405.

**Lu, B., G. Stubbs, y J. N. Culver.** 1996. Carboxylate interactions involved in the disassembly of tobacco mosaic tobamovirus. *Virology* **225**:11-20.

**Luna, E.** 2010. Aproximaciones de cápsidas más estables del virus de la fiebre aftosa y estudio de la generación de mutaciones compensatorias. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

**Luna, E., A. Rodríguez-Huete, V. Rincón, R. Mateo, y M. G. Mateu.** 2009. Systematic study of the genetic response of a variable virus to the introduction of deleterious mutations in a functional capsid region. *J Virol* **83**:10140-51.

**Ma, M., N. Jin, G. Shen, G. Zhu, H. J. Liu, M. Zheng, H. Lu, X. Huo, M. Jin, G. Yin, H. Ma, X. Li, Y. Ji, y K. Jin.** 2008b. Immune responses of swine inoculated with a recombinant fowlpox virus co-expressing P12A and 3C of FMDV and swine IL-18. *Vet Immunol Immunopathol* **121**:1-7.

**Ma, Y., J. Yates, Y. Liang, S. M. Lemon, y M. Yi.** 2008a. NS3 helicase domains involved in infectious intracellular hepatitis C virus particle assembly. *J Virol* **82**:7624-39.

**Mahy, B. W.** 2005. Introduction and history of foot-and-mouth disease virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **288**:1-8.

**Martín-Acebes, M. A., M. Gonzalez-Magaldi, K. Sandvig, F. Sobrino, y R. Armas-Portela.** 2007. Productive entry of type C foot-and-mouth disease virus into susceptible cultured cells requires clathrin and is dependent on the presence of plasma membrane cholesterol. *Virology* **369**:105-18.

**Martín-Acebes, M. A., M. Gonzalez-Magaldi, A. Vazquez-Calvo, R. Armas-Portela, y F. Sobrino.** 2009. Internalization of swine vesicular disease virus into cultured cells: a comparative study with foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **83**:4216-26.

**Martín-Acebes, M. A., V. Rincón, R. Armas-Portela, M. G. Mateu, y F. Sobrino.** 2010. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid lability and confer resistance to acid-dependent uncoating inhibition. *J Virol* **84**:2902-12.

**Martín-Acebes, M. A., A. Vazquez-Calvo, V. Rincón, M. G. Mateu, y F. Sobrino.** 2011. A single amino acid substitution in the capsid of foot-and-mouth disease virus can increase acid resistance. *J Virol* **85**:2733-40.

**Martínez, M. A., J. Dopazo, J. Hernández, M. G. Mateu, F. Sobrino, E. Domingo, y N. J. Knowles.** 1992. Evolution of the capsid protein genes of foot-and-mouth disease virus: antigenic variation without accumulation of amino acid substitutions over six decades. *J Virol* **66**:3557-65.

**Martínez, M. A., N. Verdaguer, M. G. Mateu, y E. Domingo.** 1997. Evolution subverting

essentiality: dispensability of the cell attachment Arg-Gly-Asp motif in multiply passaged foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**:6798-802.

**Martínez-Salas, E., y E. Domingo.** 1995. Effect of expression of the aphthovirus protease 3C on viral infection and gene expression. *Virology* **212**:111-20.

**Martínez-Salas, E., E. Linney, J. Hassell, y M. L. DePamphilis.** 1989. The need for enhancers in gene expression first appears during mouse development with formation of the zygotic nucleus. *Genes Dev* **3**:1493-506.

**Martínez-Salas, E., S. López de Quinto, R. Ramos, y O. Fernández-Miragall.** 2002. IRES elements: features of the RNA structure contributing to their activity. *Biochimie* **84**:755-63.

**Martínez-Salas, E., A. Pacheco, P. Serrano, and N. Fernández.** 2008. New insights into internal ribosome entry site elements relevant for viral gene expression. *J Gen Virol* **89**:611-26.

**Martínez-Salas, E., J. C. Sáiz, M. Dávila, G. J. Belsham, y E. Domingo.** 1993. A single nucleotide substitution in the internal ribosome entry site of foot-and-mouth disease virus leads to enhanced cap-independent translation in vivo. *J Virol* **67**:3748-55.

**Mason, P. W., B. Baxt, F. Brown, J. Harber, A. Murdin, y E. Wimmer.** 1993. Antibody-complexed foot-and-mouth disease virus, but not poliovirus, can infect normally insusceptible cells via the Fc receptor. *Virology* **192**:568-77.

**Mason, P. W., M. J. Grubman, y B. Baxt.** 2003. Molecular basis of pathogenesis of FMDV. *Virus Res* **91**:9-32.

**Mateo, R.** 2004. Disección funcional de las interfases entre subunidades de la cápsida del virus de la fiebre aftosa y aproximaciones al diseño de cápsidas más estables. Tesis Doctoral. Universidad Autónoma de Madrid.

**Mateo, R., A. Díaz, E. Baranowski, y M. G. Mateu.** 2003. Complete alanine scanning of intersubunit interfaces in a foot-and-mouth disease virus capsid reveals critical contributions of many side chains to particle stability and viral function. *J Biol Chem* **278**:41019-27.

**Mateo, R., E. Luna, y M. G. Mateu.** 2007. Thermostable variants are not generally represented in foot-and-mouth disease virus quasispecies. *J Gen Virol* **88**:859-64.

**Mateo, R., E. Luna, V. Rincón, y M. G. Mateu.** 2008. Engineering viable foot-and-mouth disease viruses with increased thermostability as a step in the development of improved vaccines. *J Virol* **82**:12232-40.

**Mateo, R., y M. G. Mateu.** 2007. Deterministic, compensatory mutational events in the capsid of foot-and-mouth disease virus in response to the introduction of mutations found in viruses from persistent infections. *J Virol* **81**:1879-87.

**Mateu, M. G.** 1995. Antibody recognition of picornaviruses and escape from neutralization: a structural view. *Virus Res* **38**:1-24.

**Mateu, M. G.** 2002. Conformational stability of dimeric and monomeric forms of the C-terminal domain of human immunodeficiency virus-1 capsid protein. *J Mol Biol* **318**:519-31.

**Mateu, M. G.** 2009. The capsid protein of human immunodeficiency virus: intersubunit

interactions during virus assembly. *FEBS J* **276**:6098-109.

**Mateu, M. G.** 2011. Virus engineering: functionalization and stabilization. *Protein Eng Des Sel* **24**:53-63.

**Mateu, M. G., J. L. Da Silva, E. Rocha, D. L. De Brum, A. Alonso, L. Enjuanes, E. Domingo, y H. Barahona.** 1988. Extensive antigenic heterogeneity of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *Virology* **167**:113-24.

**Mateu, M. G., C. Escarmís, y E. Domingo.** 1998. Mutational analysis of discontinuous epitopes of foot-and-mouth disease virus using an unprocessed capsid protomer precursor. *Virus Res* **53**:27-37.

**Mateu, M. G., J. Hernández, M. A. Martínez, D. Feigelstock, S. Lea, J. J. Pérez, E. Giralt, D. Stuart, E. L. Palma, y E. Domingo.** 1994. Antigenic heterogeneity of a foot-and-mouth disease virus serotype in the field is mediated by very limited sequence variation at several antigenic sites. *J Virol* **68**:1407-17.

**Mateu, M. G., M. A. Martínez, L. Capucci, D. Andreu, E. Giralt, F. Sobrino, E. Brocchi, y E. Domingo.** 1990. A single amino acid substitution affects multiple overlapping epitopes in the major antigenic site of foot-and-mouth disease virus of serotype C. *J Gen Virol* **71 ( Pt 3)**:629-37.

**Mateu, M. G., M. A. Martínez, E. Rocha, D. Andreu, J. Parejo, E. Giralt, F. Sobrino, y E. Domingo.** 1989. Implications of a quasispecies genome structure: effect of frequent, naturally occurring amino acid substitutions on the antigenicity of foot-and-mouth disease virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:5883-7.

**Mateu, M. G., E. Rocha, O. Vicente, F. Vayreda, C. Navalpotro, D. Andreu, E. Pedrosa, E. Giralt, L. Enjuanes, y E. Domingo.** 1987. Reactivity with monoclonal antibodies of viruses from an episode of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **8**:261-74.

**Mateu, M. G., M. L. Valero, D. Andreu, y E. Domingo.** 1996. Systematic replacement of amino acid residues within an Arg-Gly-Asp-containing loop of foot-and-mouth disease virus and effect on cell recognition. *J Biol Chem* **271**:12814-9.

**Mateu, M.G. y N. Verdaguer.** 2004. Functional and structural aspects of the interaction of foot-and-mouth disease virus with antibodies. En: F. Sobrino and E. Domingo (Eds.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*, pp.223-260. Horizon Bioscience, Norfolk, UK.

**Matsubara, T., M. Sumi, H. Kubota, T. Taki, Y. Okahata, y T. Sato.** 2009. Inhibition of influenza virus infections by sialylgalactose-binding peptides selected from a phage library. *J Med Chem* **52**:4247-56.

**Matthews, D. A., W. W. Smith, R. A. Ferre, B. Condon, G. Budahazi, W. Sisson, J. E. Villafranca, C. A. Janson, H. E. McElroy, C. L. Gribskov, y *et al.*** 1994. Structure of human rhinovirus 3C protease reveals a trypsin-like polypeptide fold, RNA-binding site, and means for cleaving precursor polypeptide. *Cell* **77**:761-71.

**Mayr, G. A., J. Chinsangaram, y M. J. Grubman.** 1999. Development of replication-defective adenovirus serotype 5 containing the capsid and 3C protease coding regions of foot-and-mouth disease virus as a vaccine candidate. *Virology* **263**:496-506.

**Mayr, G. A., V. O'Donnell, J. Chinsangaram, P. W. Mason, y M. J. Grubman.** 2001. Immune

responses and protection against foot-and-mouth disease virus (FMDV) challenge in swine vaccinated with adenovirus-FMDV constructs. *Vaccine* **19**:2152-62.

**McCaffrey, K., I. Boo, K. Tewierek, M. L. Edmunds, P. Poumbourios, y H. E. Drummer.** 2012. Role of conserved cysteine residues in hepatitis C virus glycoprotein e2 folding and function. *J Virol* **86**:3961-74.

**Melby, T., y M. Westby.** 2009. Inhibitors of viral entry. *Handb Exp Pharmacol*:177-202.

**Minton, A. P.** 1983. The effect of volume occupancy upon the thermodynamic activity of proteins: some biochemical consequences. *Mol Cell Biochem* **55**:119-40.

**Minton, A. P.** 1993. Macromolecular crowding and molecular recognition. *J Mol Recognit* **6**:211-4.

**Minton, A. P.** 1998. Molecular crowding: analysis of effects of high concentrations of inert cosolutes on biochemical equilibria and rates in terms of volume exclusion. *Methods Enzymol* **295**:127-49.

**Minton, A. P.** 2001. The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem* **276**:10577-

**Moffat, K., C. Knox, G. Howell, S. J. Clark, H. Yang, G. J. Belsham, M. Ryan, y T. Wileman.** 2007. Inhibition of the secretory pathway by foot-and-mouth disease virus 2BC protein is reproduced by coexpression of 2B with 2C, and the site of inhibition is determined by the subcellular location of 2C. *J Virol* **81**:1129-39.

**Monaghan, P., S. Gold, J. Simpson, Z. Zhang, P. H. Weinreb, S. M. Violette, S. Alexandersen, y T. Jackson.** 2005. The alpha(v)beta6 integrin receptor for Foot-and-mouth disease virus is expressed constitutively on the epithelial cells targeted in cattle. *J Gen Virol* **86**:2769-80.

**Moraes, M. P., J. Chinsangaram, M. C. Brum, y M. J. Grubman.** 2003. Immediate protection of swine from foot-and-mouth disease: a combination of adenoviruses expressing interferon alpha and a foot-and-mouth disease virus subunit vaccine. *Vaccine* **22**:268-79.

**Moraes, M. P., G. A. Mayr, P. W. Mason, y M. J. Grubman.** 2002. Early protection against homologous challenge after a single dose of replication-defective human adenovirus type 5 expressing capsid proteins of foot-and-mouth disease virus (FMDV) strain A24. *Vaccine* **20**:1631-9.

**Mueller, S., J. R. Coleman, y E. Wimmer.** 2009. Putting synthesis into biology: a viral view of genetic engineering through de novo gene and genome synthesis. *Chem Biol* **16**:337-47.

**Natarajan, P., G. C. Lander, C. M. Shepherd, V. S. Reddy, C. L. Brooks, 3rd, y J. E. Johnson.** 2005. Exploring icosahedral virus structures with VIPER. *Nat Rev Microbiol* **3**:809-17.

**Nayak, A., I. G. Goodfellow, K. E. Woolaway, J. Birtley, S. Curry, y G. J. Belsham.** 2006. Role of RNA structure and RNA binding activity of foot-and-mouth disease virus 3C protein in VPg uridylylation and virus replication. *J Virol* **80**:9865-75.

**Neu, U., M. S. Maginnis, A. S. Palma, L. J. Stroh, C. D. Nelson, T. Feizi, W. J. Atwood, y T. Stehle.** 2010. Structure-function analysis of the human JC polyomavirus establishes the LSTc pentasaccharide as a functional receptor motif. *Cell Host Microbe* **8**:309-19.

**Newman, J. F., D. J. Rowlands, y F. Brown.** 1973. A physico-chemical sub-grouping of the mammalian picornaviruses. *J Gen Virol* **18**:171-80.

**Nicol, M. Q., Y. Ligertwood, M. N. Bacon, B. M. Dutia, y A. A. Nash.** 2012. A novel family of peptides with potent activity against influenza A viruses. *J Gen Virol*.

**O'Donnell, V., M. LaRocco, H. Duque, y B. Baxt.** 2005. Analysis of foot-and-mouth disease virus internalization events in cultured cells. *J Virol* **79**:8506-18.

**Oem, J. K., J. H. Park, K. N. Lee, Y. J. Kim, S. J. Kye, J. Y. Park, y H. J. Song.** 2007. Characterization of recombinant foot-and-mouth disease virus pentamer-like structures expressed by baculovirus and their use as diagnostic antigens in a blocking ELISA. *Vaccine* **25**:4112-21.

**Oliveira, A. C., D. Ishimaru, R. B. Goncalves, T. J. Smith, P. Mason, D. Sa-Carvalho, y J. L. Silva.** 1999. Low temperature and pressure stability of picornaviruses: implications for virus uncoating. *Biophys J* **76**:1270-9.

**Pacheco, A., S. Reigadas, y E. Martínez-Salas.** 2008. Riboproteomic analysis of polypeptides interacting with the internal ribosome-entry site element of foot-and-mouth disease viral RNA. *Proteomics* **8**:4782-90.

**Pacheco, J. M., M. C. Brum, M. P. Moraes, W. T. Golde, y M. J. Grubman.** 2005. Rapid protection of cattle from direct challenge with foot-and-mouth disease virus (FMDV) by a single inoculation with an adenovirus-vectored FMDV subunit vaccine. *Virology* **337**:205-9.

**Parida, S.** 2009. Vaccination against foot-and-mouth disease virus: strategies and effectiveness. *Expert Rev Vaccines* **8**:347-65.

**Patil, P. K., V. Suryanarayana, P. Bist, J. Bayry, y C. Natarajan.** 2002. Integrity of GH-loop of foot-and-mouth disease virus during virus inactivation: detection by epitope specific antibodies. *Vaccine* **20**:1163-8.

**Paton, D. J., K. J. Sumption, y B. Charleston.** 2009. Options for control of foot-and-mouth disease: knowledge, capability and policy. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **364**:2657-67.

**Perales, C., V. Martin, C. M. Ruiz-Jarabo, y E. Domingo.** 2005. Monitoring sequence space as a test for the target of selection in viruses. *J Mol Biol* **345**:451-9.

**Pereira, H. G.** 1976. Subtyping of foot-and-mouth disease virus. *Dev Biol Stand* **35**:167-74.

**Pereira, H.G.** 1981. Foot-and-mouth disease. En: Gibbs EPJ (Ed). *Virus diseases of food animals*. pp 167-174. Academic Press, New York.

**Pérez, R., M. Castellanos, A. Rodríguez-Huete, y M. G. Mateu.** 2011. Molecular determinants of self-association and rearrangement of a trimeric intermediate during the assembly of a parvovirus capsid. *J Mol Biol* **413**:32-40.

**Piccone, M. E., M. Zellner, T. F. Kumosinski, P. W. Mason, y M. J. Grubman.** 1995. Identification of the active-site residues of the L proteinase of foot-and-mouth disease virus. *J Virol* **69**:4950-6.

**Pluimers, F. H., A. M. Akkerman, P. van der Wal, A. Dekker, y A. Bianchi.** 2002. Lessons from the foot and mouth disease outbreak in The Netherlands in 2001. *Rev Sci Tech* **21**:711-21.

**Pokrovskii, M. V., C. O. Bush, R. K. Beran, M. F. Robinson, G. Cheng, N. Tirunagari, M. Fenaux, A. E. Greenstein, W. Zhong, W. E. t. Delaney, y M. S. Paulson.** 2011. Novel mutations in a tissue culture-adapted hepatitis C virus strain improve infectious-virus stability and markedly enhance infection kinetics. *J Virol* **85**:3978-85.

**Porotto, M., P. Carta, Y. Deng, G. E. Kellogg, M. Whitt, M. Lu, B. A. Mungall, y A. Moscona.** 2007. Molecular determinants of antiviral potency of paramyxovirus entry inhibitors. *J Virol* **81**:10567-74.

**Powell, S. K., M. A. Kaloss, A. Pinkstaff, R. McKee, I. Burimski, M. Pensiero, E. Otto, W. P. Stemmer, y N. W. Soong.** 2000. Breeding of retroviruses by DNA shuffling for improved stability and processing yields. *Nat Biotechnol* **18**:1279-82.

**Prasad, B. V., y M. F. Schmid.** 2012. Principles of virus structural organization. *Adv Exp Med Biol* **726**:17-47.

**Racaniello, V.R.** 2007. Picornaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe D. M, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus (Eds.), *Fields Virology*. p.p. 795-838. Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.

**Racaniello, V.R.** 2001. Picornaviridae: The viruses and their replication. En: Knipe D. M, P.M. Howley, D.E. Griffin, R.A. Lamb, M.A. Martin, B. Roizman, S.E. Straus (Eds.), *Fields Virology*. p.p. 685-722. Wolters Kluwer/Lippincott Williams and Wilkins. Philadelphia.

**Reddy, V. S., P. Natarajan, B. Okerberg, K. Li, K. V. Damodaran, R. T. Morton, C. L. Brooks, 3rd, y J. E. Johnson.** 2001. Virus Particle Explorer (VIPER), a website for virus capsid structures and their computational analyses. *J Virol* **75**:11943-7.

**Reguera, J., A. Carreira, L. Riobos, J. M. Almendral, y M. G. Mateu.** 2004. Role of interfacial amino acid residues in assembly, stability, and conformation of a spherical virus capsid. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**:2724-9.

**Reguera, J., E. Grueso, A. Carreira, C. Sanchez-Martínez, J. M. Almendral, y M. G. Mateu.** 2005. Functional relevance of amino acid residues involved in interactions with ordered nucleic acid in a spherical virus. *J Biol Chem* **280**:17969-77.

**Reynolds, C., D. Birnby, y M. Chow.** 1992. Folding and processing of the capsid protein precursor P1 is kinetically retarded in neutralization site 3B mutants of poliovirus. *J Virol* **66**:1641-8.

**Rieder, E., T. Bunch, F. Brown, y P. W. Mason.** 1993. Genetically engineered foot-and-mouth disease viruses with poly(C) tracts of two nucleotides are virulent in mice. *J Virol* **67**:5139-45.

**Rincón, V., R. Bocanegra, A. Rodríguez-Huete, G. Rivas, y M. G. Mateu.** 2011. Effects of macromolecular crowding on the inhibition of virus assembly and virus-cell receptor recognition. *Biophys J* **100**:738-46.

**Rodríguez, L. L., y C. G. Gay.** 2011. Development of vaccines toward the global control and eradication of foot-and-mouth disease. *Expert Rev Vaccines* **10**:377-87.

**Rodríguez, L. L., y M. J. Grubman.** 2009. Foot and mouth disease virus vaccines. *Vaccine* **27 Suppl 4**:D90-4.



- Rodríguez Pulido, M., P. Serrano, M. Sáiz, y E. Martínez-Salas.** 2007. Foot-and-mouth disease virus infection induces proteolytic cleavage of PTB, eIF3a,b, and PABP RNA-binding proteins. *Virology* **364**:466-74.
- Roosien, J., G. J. Belsham, M. D. Ryan, A. M. King, y J. M. Vlak.** 1990. Synthesis of foot-and-mouth disease virus capsid proteins in insect cells using baculovirus expression vectors. *J Gen Virol* **71** ( Pt 8):1703-11.
- Rossmann, M. G., y J. E. Johnson.** 1989. Icosahedral RNA virus structure. *Annu Rev Biochem* **58**:533-73.
- Rossmann, M. G., M. C. Morais, P. G. Leiman, y W. Zhang.** 2005. Combining X-ray crystallography and electron microscopy. *Structure* **13**:355-62.
- Rowlands, D. J., D. V. Sangar, y F. Brown.** 1975. A comparative chemical and serological study of the full and empty particles of foot-and mouth disease virus. *J Gen Virol* **26**:227-38.
- Rueckert, R.R.** 1996. Picornaviridae: The viruses and their replication. En. Fields. B., D.M. Knipe, P. M. Howley. (Eds.), *Virology* (Third edition), pp. 609-654. Lippincot-Raven Publishers, Philadelphia.
- Rweyemamu, M., P. Roeder, D. Mackay, K. Sumption, J. Brownlie, Y. Leforban, J. F. Valarcher, N. J. Knowles, y V. Saraiva.** 2008. Epidemiological patterns of foot-and-mouth disease worldwide. *Transbound Emerg Dis* **55**:57-72.
- Ryan, M. D., M.L. Donnelly, M. Flint, V. Cowton, G. Luke, L.E. Hughes, C. Knox, y De P. Felipe.** 2004. Foot-and-mouth disease virus proteinases. En. F. Sobrino and E. Domingo (Eds.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*, pp.53-77. Horinzon Bioscience, Norfolk, UK.
- Rychlowska, M., A. M. Owsianka, S. K. Fount, J. Dubuisson, K. Bienkowska-Szewczyk, y A. H. Patel.** 2011. Comprehensive linker-scanning mutagenesis of the hepatitis C virus E1 and E2 envelope glycoproteins reveals new structure-function relationships. *J Gen Virol* **92**:2249-61.
- Sa-Carvalho, D., E. Rieder, B. Baxt, R. Rodarte, A. Tanuri, y P. W. Mason.** 1997. Tissue culture adaptation of foot-and-mouth disease virus selects viruses that bind to heparin and are attenuated in cattle. *J Virol* **71**:5115-23.
- Saini, V., V. P. Zharov, C. S. Brazel, D. E. Nikles, D. T. Johnson, y M. Everts.** 2006. Combination of viral biology and nanotechnology: new applications in nanomedicine. *Nanomedicine* **2**:200-6.
- Sáiz, J. C., J. Cairo, M. Medina, D. Zuidema, C. Abrams, G. J. Belsham, E. Domingo, y J. M. Vlak.** 1994. Unprocessed foot-and-mouth disease virus capsid precursor displays discontinuous epitopes involved in viral neutralization. *J Virol* **68**:4557-64.
- Sáiz, M., S. Gomez, E. Martínez-Salas, y F. Sobrino.** 2001. Deletion or substitution of the aphthovirus 3' NCR abrogates infectivity and virus replication. *J Gen Virol* **82**:93-101.
- Salt, J.** 2004. Persistence of foot-and-mouth disease virus. F. Sobrino and E. Domingo (Eds.), *Foot-and-mouth disease. Current perspectives*, pp.103-144. Horinzon Bioscience, Norfolk, UK.
- Salt, J. S.** 1993. The carrier state in foot and mouth disease--an immunological review. *Br Vet J* **149**:207-23.

**Samai, P., y S. Shuman.** 2011. Structure-function analysis of the OB and latch domains of chlorella virus DNA ligase. *J Biol Chem* **286**:22642-52.

**Sanjuán, R.** 2010. Mutational fitness effects in RNA and single-stranded DNA viruses: common patterns revealed by site-directed mutagenesis studies. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**:1975-82.

**Sanz-Parra, A., F. Sobrino, y V. Ley.** 1998. Infection with foot-and-mouth disease virus results in a rapid reduction of MHC class I surface expression. *J Gen Virol* **79** ( Pt 3):433-6.

**Sayle, R. A., y E. J. Milner-White.** 1995. RASMOL: biomolecular graphics for all. *Trends Biochem Sci* **20**:374.

**Scodeller, E. A., M. A. Lebendiker, M. S. Dubra, O. A. Crespo, O. Basarab, J. L. La Torre, y C. Vásquez.** 1984. Inactivation of foot-and-mouth disease virus vaccine strains by activation of virus-associated endonuclease. *J Gen Virol* **65** ( Pt 9):1567-73.

**Scudamore, J. M., G. M. Trevelyan, M. V. Tas, E. M. Varley, y G. A. Hickman.** 2002. Carcass disposal: lessons from Great Britain following the foot and mouth disease outbreaks of 2001. *Rev Sci Tech* **21**:775-87.

**Serrano, P., M. R. Pulido, M. Sáiz, y E. Martínez-Salas.** 2006. The 3' end of the foot-and-mouth disease virus genome establishes two distinct long-range RNA-RNA interactions with the 5' end region. *J Gen Virol* **87**:3013-22.

**Singh, P., M.J. González, y M. Manchester.** 2006. Viruses and their uses in nanotechnology. *Drug Development Research*. **67**: 23–41.

**Smyth, M. S., y J. H. Martin.** 2002. Picornavirus uncoating. *Mol Pathol* **55**:214-9.

**Snyder, A. J., K. J. Sokoloski, y S. Mukhopadhyay.** 2012. Mutating conserved cysteines in the alphavirus e2 glycoprotein causes virus-specific assembly defects. *J Virol* **86**:3100-11.

**Sobrinho, F., M. Dávila, J. Ortín, y E. Domingo.** 1983. Multiple genetic variants arise in the course of replication of foot-and-mouth disease virus in cell culture. *Virology* **128**:310-8.

**Sobrinho, F y E. Domingo.** 2004. Foot-and-mouth disease: Current Perspectives, Horizon Bioscience, Wymondham, England.

**Sobrinho, F., y E. Domingo.** 2001. Foot-and-mouth disease in Europe. FMD is economically the most important disease of farm animals. Its re-emergence in Europe is likely to have consequences that go beyond severe alterations of livestock production and trade. *EMBO Rep* **2**:459-61.

**Sobrinho, F., M. Sáiz, M. A. Jimenez-Clavero, J. I. Nunez, M. F. Rosas, E. Baranowski, y V. Ley.** 2001. Foot-and-mouth disease virus: a long known virus, but a current threat. *Vet Res* **32**:1-30.

**Someya, Y., and N. Takeda.** 2011. Functional consequences of mutational analysis of norovirus protease. *FEBS Lett* **585**:369-74.

**Steinmetz, N. F., T. Lin, G. P. Lomonosoff, y J. E. Johnson.** 2009. Structure-based engineering of an icosahedral virus for nanomedicine and nanotechnology. *Curr Top Microbiol Immunol* **327**:23-58.



- Stonehouse, N. J., y P. G. Stockley.** 1993. Effects of amino acid substitution on the thermal stability of MS2 capsids lacking genomic RNA. *FEBS Lett* **334**:355-9.
- Sutmöller, P., S. S. Barteling, R. C. Olascoaga, y K. J. Sumption.** 2003. Control and eradication of foot-and-mouth disease. *Virus Res* **91**:101-44.
- Takeda, N., R. J. Kuhn, C. F. Yang, T. Takegami, y E. Wimmer.** 1986. Initiation of poliovirus plus-strand RNA synthesis in a membrane complex of infected HeLa cells. *J Virol* **60**:43-53.
- Thomas, A. A., H. O. Voorma, y A. Boeye.** 1983. Relationship between synthesis and cleavage of poliovirus-specific proteins. *J Virol* **48**:309-13.
- Thompson, D., P. Muriel, D. Russell, P. Osborne, A. Bromley, M. Rowland, S. Creigh-Tyte, y C. Brown.** 2002. Economic costs of the foot and mouth disease outbreak in the United Kingdom in 2001. *Rev Sci Tech* **21**:675-87.
- Timoney, J. F., J.H. Gillespie, F.W. Scott, y J.E. Barlough.** 1988. En. Hagan and Bruner's microbiology and infectious diseases of domestic animals, pp. 647- 667. Comstock Publishing Associates, Cornell University Press, Ithaca, London.
- Toja, M., C. Escarmís, y E. Domingo.** 1999. Genomic nucleotide sequence of a foot-and-mouth disease virus clone and its persistent derivatives. Implications for the evolution of viral quasispecies during a persistent infection. *Virus Res* **64**:161-71.
- Tuthill, T. J., E. Groppelli, J. M. Hogle, y D. J. Rowlands.** 2010. Picornaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **343**:43-89.
- Tuthill, T. J., D. J. Rowlands, y R. A. Killington.** 2007. Picornaviruses entry. *Future virol.* 2: 343-351.
- Twomey, T., L. L. France, S. Hassard, T. G. Burrage, J. F. Newman, y F. Brown.** 1995. Characterization of an acid-resistant mutant of foot-and-mouth disease virus. *Virology* **206**:69-75.
- Vakharia, V. N., M. A. Devaney, D. M. Moore, J. J. Dunn, y M. J. Grubman.** 1987. Proteolytic processing of foot-and-mouth disease virus polyproteins expressed in a cell-free system from clone-derived transcripts. *J Virol* **61**:3199-207.
- van Vlijmen, H. W., S. Curry, M. Schaefer, y M. Karplus.** 1998. Titration calculations of foot-and-mouth disease virus capsids and their stabilities as a function of pH. *J Mol Biol* **275**:295-308.
- Vásquez, C., C. D. Denoya, J. L. La Torre, y E. L. Palma.** 1979. Structure of foot-and-mouth disease virus capsid. *Virology* **97**:195-200.
- Verdaguer, N., M. G. Mateu, D. Andreu, E. Giralt, E. Domingo, y I. Fita.** 1995. Structure of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus complexed with a neutralizing antibody: direct involvement of the Arg-Gly-Asp motif in the interaction. *EMBO J* **14**:1690-6.
- Verdaguer, N., M. G. Mateu, J. Bravo, J. Tormo, E. Giralt, D. Andreu, E. Domingo, y I. Fita.** 1994. Crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of a monoclonal antibody Fab fragment against foot-and-mouth disease virus and of its complex with the main antigenic site peptide. *Proteins* **18**:201-3.
- Verdaguer, N., G. Schoehn, W. F. Ochoa, I. Fita, S. Brookes, A. King, E. Domingo, M. G.**

- Mateu, D. Stuart, y E. A. Hewat.** 1999. Flexibility of the major antigenic loop of foot-and-mouth disease virus bound to a Fab fragment of a neutralising antibody: structure and neutralisation. *Virology* **255**:260-8.
- Verlinden, Y., A. Cuconati, E. Wimmer, y B. Rombaut.** 2000. Cell-free synthesis of poliovirus: 14S subunits are the key intermediates in the encapsidation of poliovirus RNA. *J Gen Virol* **81**:2751-4.
- Vitagliano, L., G. Fiume, P. L. Scognamiglio, N. Doti, R. Cannavo, A. Puca, C. Pedone, G. Scala, I. Quinto, y D. Marasco.** 2011. Structural and functional insights into IkappaB-alpha/HIV-1 Tat interaction. *Biochimie* **93**:1592-600.
- Vitiello, M., y M. Galdiero.** 2009. Inhibition of viral-induced membrane fusion by peptides. *Protein Pept Lett* **16**:786-93.
- Vleck, S. E., S. L. Oliver, J. J. Brady, H. M. Blau, J. Rajamani, M. H. Sommer, y A. M. Arvin.** 2011. Structure-function analysis of varicella-zoster virus glycoprotein H identifies domain-specific roles for fusion and skin tropism. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**:18412-7.
- Vriend, G.** 1990. WHAT IF: a molecular modeling and drug design program. *J Mol Graph* **8**:52-6, 29.
- Vu, H. N., J. D. Ramsey, y D. W. Pack.** 2008. Engineering of a stable retroviral gene delivery vector by directed evolution. *Mol Ther* **16**:308-14.
- Wang, H., A. Planchart, y G. Stubbs.** 1998. Caspar carboxylates: the structural basis of tobamovirus disassembly. *Biophys J* **74**:633-8.
- Whitfield, T., A. J. Miles, J. C. Scheinost, J. Offer, P. Wentworth, Jr., R. A. Dwek, B. A. Wallace, P. C. Biggin, y N. Zitzmann.** 2011. The influence of different lipid environments on the structure and function of the hepatitis C virus p7 ion channel protein. *Mol Membr Biol* **28**:254-64.
- Wickramasekera, N. T., y P. Traktman.** 2010. Structure/Function analysis of the vaccinia virus F18 phosphoprotein, an abundant core component required for virion maturation and infectivity. *J Virol* **84**:6846-60.
- Wright, W.** 1930. *Hieromyni Fracastorii De Contagione et Contagiosis Morbis et Eorum Curatione*, New and London.
- Wu, Y. M., C. H. Hsu, C. H. Wang, W. Liu, W. H. Chang, y C. S. Lin.** 2008. Role of the DxxDxD motif in the assembly and stability of betanodavirus particles. *Arch Virol* **153**:1633-42.
- Xiang, W., A. Cuconati, D. Hope, K. Kirkegaard, y E. Wimmer.** 1998. Complete protein linkage map of poliovirus P3 proteins: interaction of polymerase 3Dpol with VPg and with genetic variants of 3AB. *J Virol* **72**:6732-41.
- Xie, Q., T. F. Lerch, N. L. Meyer, y M. S. Chapman.** 2011. Structure-function analysis of receptor-binding in adeno-associated virus serotype 6 (AAV-6). *Virology* **420**:10-9.
- Yang, R., J. Shi, I. J. Byeon, J. Ahn, J. H. Sheehan, J. Meiler, A. M. Gronenborn, y C. Aiken.** 2012. Second-site suppressors of HIV-1 capsid mutations: restoration of intracellular activities without correction of intrinsic capsid stability defects. *Retrovirology* **9**:30.

- Yu, X., Q. Wang, J. C. Yang, I. Buch, C. J. Tsai, B. Ma, S. Z. Cheng, R. Nussinov, y J. Zheng.** 2009. Mutational analysis and allosteric effects in the HIV-1 capsid protein carboxyl-terminal dimerization domain. *Biomacromolecules* **10**:390-9.
- Zhang, L., J. Zhang, H. T. Chen, J. H. Zhou, L. N. Ma, Y. Z. Ding, y Y. S. Liu.** 2011. Research in advance for FMD novel vaccines. *Virology* **8**:268.
- Zhao, Q., J. M. Pacheco, y P. W. Mason.** 2003. Evaluation of genetically engineered derivatives of a Chinese strain of foot-and-mouth disease virus reveals a novel cell-binding site which functions in cell culture and in animals. *J Virol* **77**:3269-80.
- Zhou, H. X., G. Rivas, y A. P. Minton.** 2008. Macromolecular crowding and confinement: biochemical, biophysical, and potential physiological consequences. *Annu Rev Biophys* **37**:375-97.
- Zhou, S., y D. N. Standring.** 1992. Cys residues of the hepatitis B virus capsid protein are not essential for the assembly of viral core particles but can influence their stability. *J Virol* **66**:5393-8.
- Zibert, A., G. Maass, K. Strebel, M. M. Falk, y E. Beck.** 1990. Infectious foot-and-mouth disease virus derived from a cloned full-length cDNA. *J Virol* **64**:2467-73.
- Zimmerman, S. B., y A. P. Minton.** 1993. Macromolecular crowding: biochemical, biophysical, and physiological consequences. *Annu Rev Biophys Biomol Struct* **22**:27-65.
- Zlotnick, A y A.F. Bentley.** 2011. Mechanisms of Icosahedral Virus Assembly. En: Agbandje-McKenna y M., R. McKenna (Eds.), *Structural Virology*, pp. 180-202. Royal Society of Chemistry. RSC biomolecular sciences. Cambridge.

